

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL II



ESTUDIO MORFOLÓGICO COMPARADO DE LOS CARACTERES
GENERATIVOS EN RELACIÓN CON LINAJES MONOFILÉTICOS DE LA
FAMILIA *PARMELIACEAE* (LECANORALES, ASCOMYCOTA)

TESIS DOCTORAL DE:

ZUZANA FERENCOVA

DIRIGIDA POR:

**ANA M. CRESPO DE LAS CASAS
PALOMA CUBAS DOMÍNGUEZ**

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Biología Vegetal II



**ESTUDIO MORFOLÓGICO COMPARADO DE LOS
CARACTERES GENERATIVOS
EN RELACIÓN CON LINAJES MONOFILÉTICOS DE LA
FAMILIA *PARMELIACEAE*
(LECANORALES, ASCOMYCOTA)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Zuzana FERENCOVA

Bajo la dirección de las doctoras
Ana M. CRESPO DE LAS CASAS y Paloma CUBAS DOMÍNGUEZ

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Biología Vegetal II



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MORFOLÓGICO COMPARADO DE LOS
CARACTERES GENERATIVOS
EN RELACIÓN CON LINAJES MONOFILÉTICOS DE LA
FAMILIA *PARMELIACEAE*
(LECANORALES, ASCOMYCOTA)**

Zuzana FERENCOVA

MADRID 2012

Dra. Ana M. Crespo de las Casas,

Catedrática de Universidad del Departamento de Biología Vegetal II (Universidad Complutense de Madrid)

y

Dra. Paloma Cubas Domínguez,

Profesora Titular del Departamento de Biología Vegetal II (Universidad Complutense de Madrid)

INFORMAN:

Que la Licenciada **Zuzana FERENCOVA** ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada "**Estudio morfológico comparado de los caracteres generativos en relación con linajes monofiléticos de la familia *Parmeliaceae* (Lecanorales, Ascomycota)**" que presenta en el Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor con mención de Doctorado Europeo, y autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente informe en Madrid a 6 de Septiembre de 2012.

Vº Bº Directora de Tesis
Dra. Ana M. CRESPO DE LAS CASAS

Vº Bº Directora de Tesis
Dra. Paloma CUBAS DOMÍNGUEZ

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una Beca Predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia y se ha llevado a cabo en el grupo SYSTEMOL de la Universidad Complutense de Madrid. Mi agradecimiento a ambas instituciones.

Quiero agradecer a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, participaron en este trabajo, porque no hubiera sido posible a terminarlo sin la ayuda, los consejos, el apoyo y el cariño que he recibido a lo largo de todos los años que ha durado.

En primer lugar agradezco a Ana Crespo y a Paloma Cubas, directoras de esta Tesis Doctoral, por haber confiado en mí desde que nos hemos conocido. Gracias por haberme ofrecido la posibilidad de formar parte de vuestro equipo, por enseñarme como hacer una buena investigación, por apoyarme en los momentos críticos, por supervisar este trabajo y por animarme infinitamente. Gracias por tener paciencia conmigo durante estos largos años y por confiar de que mi "tercera hija" iba a nacer algún día.

Gracias a David L. Hawksworth por dedicarme su tiempo para discutir sobre mis trabajos y ayudarme a buscar un consenso entre mis interpretaciones atrevidas y las suyas basadas en su gran conocimiento micológico.

Gracias a Dr. Martin Bačkor, quien fue mi primer tutor en el mundo de los líquenes y gracias a él he podido a conocer a mis directoras de Tesis. Gracias también por haberme acogido durante mi estancia en su laboratorio. Martin, moja obrovská vd'aka.

Mis agradecimientos a Alan Green, siempre disponible a corregir mis redacciones en inglés.

Al personal del CAI "Centro de microscopía electrónica Luis Bru" de UCM, que compartieron sus conocimientos conmigo y que me enseñaron el misterioso mundo ultraestructural. Marisa, Ana, Agustín, Eugenio y Alfonso muchas gracias por responder a todas mis preguntas, por la ayuda con las interpretaciones de las observaciones y por dejarme manejar "casi" todos los aparatos. Gracias también por el apoyo para no tirar la toalla.

Gracias a todos mis compañeros del Departamento de Biología Vegetal II, todos los que compartieron conmigo las clases de doctorado, la mesa en el laboratorio, el microscopio, el ordenador, la silla, las galletas, las comidas, las largas discusiones sobre los temas más variopintos. Gracias por haber estado a mi lado en los momentos de felicidad y en los de tristeza e indignación. No os voy a nombrar para no olvidarme de nadie, pero cada uno sabe que se encuentra en estos agradecimientos.

A mis padres y hermanos que entendieron mi salida de casa como una gran oportunidad y que no dejaron de confiar en mí; porque ellos confiaron en que iba a poder acabar con la Tesis y no la Tesis conmigo. Mami, oci, Martina a Kamil, Ľubo, d'akujem vám, aj napriek vzdialenosti ste mi boli veľkou oporou.

A Víctor, que desde que apareció en mi vida me ha apoyado y animado a diario a pesar de creer que el objeto de mi investigación es el níquel en vez del líquen. Gracias por estar compartiendo la vida conmigo. Gracias a mis pequeñas princesas, Elisa y Laura, que me hicieron madurar y dieron a mi vida mucho más sentido desde que vinieron ellas a este mundo.

A mi familia
Mojej rodine

ÍNDICE

Resumen 1

Abstract 4

Introducción 7

Objetivos 27

Material 29

Métodos 39

Capítulo I. Estructura del apotecio en la familia *Parmeliaceae*, con especial referencia al excípulo propio. Anatomía, ontogenia y significado filogenético. 43

Capítulo II. Las esporas en la familia *Parmeliaceae*: su valor taxonómico y filogenético 99

Capítulo III. The arachiform vacuolar body: an overlooked shared character in the ascospores of a large monophyletic group within *Parmeliaceae* (Xanthoparmelia clade, Lecanorales) 157

Capítulo IV. *Austroparmelia*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) 167

Capítulo V. *Notoparmelia*, a new genus based on the overlooked apothecial anatomy and distribution pattern 183

Capítulo VI. A discussion about reproductive modes of *Pseudevernia furfuracea* based on phylogenetic data 209

Discusión general 223

Conclusiones 231

Conclusions 234

Bibliografía 236

RESUMEN

La distribución de los caracteres morfológicos, anatómicos, químicos, ecológicos o biogeográficos hasta ahora empleados en la sistemática de los parmeliáceos no refleja la topología subfamiliar reconstruida con los datos moleculares. El amplio número de datos moleculares disponibles para los líquenes parmelioides permite establecer el valor filogenético de diferentes caracteres a nivel genérico. Sin embargo un carácter por sí mismo no tiene valor taxonómico *a priori* pero puede ser significativo cuando está correlacionado con otros caracteres independientes. Esto sin embargo solo puede ser evaluado *a posteriori*.

Por eso la investigación planteada en esta tesis busca encontrar nuevos caracteres y evaluar su valor taxonómico y filogenético, estudiando de manera comparada representantes de todos los clados parmelioides. Se eligieron los órganos de reproducción sexual por estar considerados como los caracteres con mayor validez e importancia en la taxonomía de los ascomicetes no liquenizados, y por estar menos influenciados por los factores ambientales que los caracteres vegetativos. En los parmeliáceos estos caracteres han sido infrautilizados, especialmente en el caso de los parmelioides, ya que un gran porcentaje de las especies descritas solo se conocen estériles o, al menos, el tipo es estéril. No obstante, algunos autores han hecho hincapié en la importancia de las estructuras reproductoras y la presente memoria doctoral se centra en las estructuras reproductoras como carácter adicional en la delimitación de los taxones parmeliáceos.

Para los estudios morfológicos y anatómicos en este trabajo se han empleado diferentes metodologías, principalmente microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Puntualmente se realizaron los estudios con las siguientes técnicas: microscopía confocal de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido, estudios químicos (test de reacción y cromatografía sobre capa fina) y análisis estadísticos (análisis de regresión simple, análisis de subgrupo y tabulación cruzada). Los estudios moleculares y filogenéticos incluyeron la extracción y amplificación de ADN, alineamiento de secuencias, y análisis de distancias, parsimonia, bayesiano y Maximum Likelihood.

Se ha realizado un estudio comparado de la organización del apotecio en 150 especies de *Parmeliaceae*. Los resultados confirman que la presencia de un excípulo propio cupulado en los apotecios de *Parmeliaceae* es una característica única dentro de Lecanoromycetes. Además este apotecio tiene un desarrollo ontogénico peculiar ya que el ascogonio aparece por encima de la capa algal, en lugar de por debajo de ella - dentro de la médula - como ocurre en otros Lecanoromycetes. Los apotecios de todos los parmeliáceos comparten una organización común presentando el himenio y el subhimenio bordeados por un excípulo propio, a su vez rodeado por una capa continua de algas. La anatomía fina y la anchura de las tres capas que componen el excípulo propio, capa hialina, capa intermedia y capa basal de apariencia cortical, permiten

establecer cinco tipos diferenciados. Estos tipos no muestran un patrón filogenético claro, ya que existe variabilidad dentro de los distintos clados principales pero en algunos casos el tipo de apotecio proporciona caracteres de apoyo para la delimitación de nuevos géneros (por ejemplo *Austroparmelia*, *Remototrachyna*, *Notoparmelia*) de *Parmeliaceae*.

La variabilidad de la morfología esporal (ultraestructura, forma y dimensiones) se ha estudiado en 92 especies, que representan la mayoría de los clados de parmelioides, y en otras 15 especies de parmeliáceos. La ultraestructura de la pared esporal presenta un patrón común: la pared está compuesta de cuatro capas que varían en grosor en distintos grupos. Las variaciones en grosor de la pared, junto con el tamaño y forma de la espora, y el aspecto del vacuoma permiten establecer cinco tipos de esporas. Los principales clados parmelioides no están caracterizados por un único tipo de esporas, ya que presentan gran variabilidad. Sin embargo los caracteres finos de la espora se pueden utilizar como carácter diagnóstico para algunos géneros (por ejemplo *Xanthoparmelia*) o para diferenciar subgrupos dentro de géneros (por ejemplo *Parmelia* s. lat., *Parmelina* s. lat., *Bulbothrix*). Además, se describe por primera vez las distintas etapas de la ascosporogénesis en la familia *Parmeliaceae*.

La utilidad de los caracteres de las estructuras reproductoras, especialmente la anatomía y morfología de detalle, como caracteres diagnósticos a distintos niveles taxonómicos en las parmeliáceas, se ha puesto de manifiesto en varios estudios particulares.

1) El valor de la morfología esporal se ha constatado en el mayor clado monofilético dentro de *Parmeliaceae*, el formado por *Xanthoparmelia* y géneros relacionados. Todas las especies de *Xanthoparmelia* tienen esporas con una vacuola única lisa, en forma de cacahuete, con diferentes grados de constricción en el plano ecuatorial. Esto difiere de la vacuola elipsoidal de otros parmelioides. Se discute la hipótesis de que la presencia de esta singular morfología en las esporas podría haber contribuido al éxito evolutivo de este grupo monofilético, ya que en el clado *Xanthoparmelia*, la reproducción sexual parece mucho más común que en otros parmelioides.

2) Mediante análisis moleculares se estableció que *Parmelina* es un género polifilético constituido por dos grandes grupos bien apoyados. Las especies de Australasia y dos especies previamente incluidas en *Canoparmelia* (*C. pruinata* y *C. macrospora*) forman un grupo anidado dentro de los parmotremoides mientras que las especies del hemisferio norte occidental, incluidas las de América del Norte y la cuenca mediterránea, forman otro grupo monofilético, no relacionado con el anterior y hermano de *Myelochroa* de la zona oriental templada de Asia. La revaluación de las características morfológicas y químicas teniendo en cuenta la filogenia observada ha permitido caracterizar el linaje monofilético formado por las especies de *Parmelina/Canoparmelia* de Australasia. Este linaje se describe como nuevo género *Austroparmelia*, en base a la correlación de rasgos morfológicos vegetativos (como la morfología del lóbulo), caracteres reproductores (tamaño de las esporas, anatomía del excípulo) y la distribución geográfica. En este caso la combinación de información filogenética-molecular

con el estudio morfológico detallado ha permitido caracterizar este nuevo linaje. Se proponen trece nuevas combinaciones en este nuevo género.

3) Un caso semejante se ha encontrado al estudiar las especies de *Parmelia* de Australasia. Se conocía que estas especies forman un linaje monofilético pero no se conocían caracteres correlacionados que sirvieran para su delimitación frente al resto de las especies de *Parmelia*. En este caso, las características peculiares de estas especies en cuanto a la anatomía del apotecio, sobre todo la estructura del excípulo propio, combinado con otros caracteres morfológicos (grosor de las paredes de las esporas, morfología de los lóbulos y tipo de rizinas) y el área de distribución, permite un diagnóstico preciso del nuevo género *Notoparmelia* que describimos en esta tesis. Se proponen 17 combinaciones nuevas.

4) Por último, se ha estudiado un caso particular del liquen común *Pseudevernia furfuracea* que puede presentar tres estrategias diferentes de reproducción. A parte de reproducirse en algunos casos mediante el proceso sexual (formación de apotecios), la forma principal de propagación asexual es mediante isidios. Pero algunos ejemplares desarrollan además soredios. Se realizaron análisis morfológicos, químicos y moleculares en ejemplares sorediados procedentes de las Islas Canarias, Marruecos y Turquía y se analizó la posición filogenética de estas muestras en la filogenia global de *Pseudevernia*. Es la primera vez que se reconstruye la filogenia de este género. Los resultados mostraron dos clados monofiléticos hermanos, uno con especies americanas (*P. intensa*, *P. cladonia*, *P. consocians*), y otro con todas las muestras de *P. furfuracea*. En este segundo grupo no se ha encontrado ninguna relación de las diferentes estrategias reproductoras con los distintos quimiotipos ni con la variabilidad molecular, por lo que consideramos que todos los especímenes entran dentro de la variabilidad de una única especie, *P. furfuracea*. Se discute la importancia biológica y taxonómica de los soralios, y su falta de validez para segregar especies (dentro del concepto de par de especies) en base a este tipo de estructuras de reproducción. Se propone la revisión de otros taxones, donde la presencia/ausencia de los soralios ha sido el carácter diagnóstico utilizado para diferenciar especies.

Los resultados del presente trabajo de investigación permite concluir que las parmeliáceas, la mayor familia de los hongos liquenizados con más de 2000 especies, comparten caracteres sinapomórficos únicos del ascoma: el tipo de ontogenia y una característica estructura, denominada excípulo propio cupulado. Además los resultados resaltan que el creciente número de datos moleculares no resta valor ni importancia a los estudios comparados morfológicos, ultraestructurales y ontogénicos, en especial de los caracteres generativos. En paralelo con los estudios filogenéticos basados en datos moleculares, es importante buscar nuevos caracteres morfológicos, y evaluar toda la información previa disponible. Esto permitirá establecer una sistemática bien fundamentada en las relaciones filogenéticas, y a la vez construir una clasificación que sea de utilidad para la comunidad científica y los gestores de la biodiversidad.

ABSTRACT

The morphological, anatomical, chemical, ecological and biogeographic characters hitherto employed in systematic of *Parmeliaceae* do not reflect the topology reconstructed by phylogenetic analyses based on molecular data. All of them are homoplasious and appear in various independent lineages. The extensive molecular data now available for the parmelioid lichens allow an assessment of the phylogenetic value of different characters at the generic level. However, a character by itself has no taxonomic value *a priori* but may be significant when correlated with other independent characters. This however, can only be evaluated *a posteriori*.

The aim of this research is to look for new characters and assess their taxonomic and phylogenetic value in the parmelioid clade (the major clade of *Parmeliaceae*), through a detailed anatomical and morphological study of the sexual reproductive organs. Sexual reproductive features are considered as the most valid and useful characters for the taxonomy of non-lichenized ascomycetes because they are thought to be less influenced by environmental factors in comparison to vegetative characters of the thallus. Despite this, these characters have been underutilized in *Parmeliaceae* due to the large number of species that are known only when sterile or, at least, the type species is sterile. However, some authors have emphasized the importance of reproductive structures and the present doctoral thesis focuses on the reproductive structures as additional character for delimitation of parmeliaceous taxa.

For general morphological and anatomical studies we have used different methodologies, mainly optical microscopy and transmission electron microscopy. In some particular cases, confocal fluorescence microscopy, scanning electron microscopy, chemical analyses (reaction test and thin layer chromatography) and statistical analysis (simple regression analysis, subgroup analysis and cross-tabulation) have also been employed. In addition, molecular and phylogenetic studies including DNA extraction and amplification, sequence alignment and distance, parsimony, Bayesian and Maximum Likelihood analysis have also been carried out.

We have performed a comparative study of 150 different species of *Parmeliaceae*. The results confirm that the structure of the cupulate proper exciple in the apothecia of *Parmeliaceae* is unique within Lecanoromycetes. Moreover, apothecium ontogeny shows another peculiar feature: the ascogonium appears above the algal layer instead of below it, inside the medulla, as occurs in other Lecanoromycetes. The apothecia of all *Parmeliaceae* share a common form with hymenium, subhymenium and hyaline layers bordered by a two-layered cortex-like proper exciple, which is girdled by a continuous algal layer. Five types of proper exciple are distinguished based on the finescale anatomy and width of the layers. The type of exciple is uniform for each species but it can vary within some genera. The apothecium anatomy does not show a clear phylogenetic pattern and the major clades do not

correlate with a single type. Despite this, in some cases it has provided supporting characters for delimitation of new genera (e.g. *Austroparmelina*, *Notoparmelia*, *Remototrachyna*) of *Parmeliaceae*.

The variability of the spore morphology (shape and dimensions, internal anatomy, ultrastructure of the spore wall) has been studied in 92 species, representing most parmelioid clades, and another fifteen species of *Parmeliaceae*. The ultrastructure of the spore wall has a common pattern, and is composed by four layers which vary in thickness in different groups. The variation in wall thickness together with the size and shape of the spore, and the appearance of vacuoles allows five types of spores to be established. Spore type is highly homoplasious and does not show a clear phylogenetic pattern. Major clades are not characterized by a single type of spore with the exception of the *Xanthoparmelia* clade. Some genera present only one type of spore and their fine features can be used as a diagnostic character (e.g. *Xanthoparmelia*). Some genera are more heterogenous and present different types of spores although, in some cases, they are correlated with phylogenetic subgroups within genera (e.g. *Parmelia* s. lat., *Parmelina* s. lat., *Bulbothrix*). Furthermore, ascosporeogenesis is described here for the first time for the *Parmeliaceae*.

The utility of the selected reproductive features, especially the detailed anatomy and morphology, as diagnostic features in different taxonomic levels of parmelioid lichens has been shown in several particular case studies.

1) The phylogenetic value of the spore morphology has been shown in the largest monophyletic clade within *Parmeliaceae*, formed by *Xanthoparmelia* and related genera. All studied species share the same type of spore with a single smooth vacuole, which is peanut-shaped, with different degrees of constriction in the equatorial plane. This differs from the ellipsoid vacuole of other parmelioids. In the *Xanthoparmelia* clade, sexual reproduction seems much more common than in other parmelioids. We discuss the hypothesis that the presence of this unique spore morphology might have contributed to the evolutionary success of this monophyletic group.

2) Molecular based phylogenetic analyses provide evidence that *Parmelina* is polyphyletic and the species fall into two major well-supported groups. The Australasian species of *Parmelina* and two species of *Canoparmelia* (*C. pruinata* and *C. macrospora*) form a group nested within the parmotrema clade, while *Parmelina* species from the Northern Hemisphere including those from western North America and the Mediterranean basin form another monophyletic group unrelated to the previous one, and forming the sister group to the East Asian temperate genus *Myelochroa*. The revaluation of morphological and chemical features in the light of the molecular phylogeny showed that some vegetative morphological characters (lobe morphology) and reproductive characters (type of spores and structure of the proper exciple) together with the geography are useful in characterizing the monophyletic

lineage of the Australasian *Parmelina*/*Canoparmelina* species. This lineage is described as the new genus *Austroparmelina*. Thirteen new combinations in the new genus are proposed.

3) A similar case was found for the *Parmelia* species of Australasia. These species form a monophyletic lineage but correlated characters for its delimitation were lacking. In this study we found a major feature shared by all the studied Australasian species of *Parmelia*: the neglected apothecial anatomy, especially that of the proper exciple which differs from all other parmelioid genera. This feature together with the thickness of spore walls and other morphological vegetative characters like lobe morphology and rhizine type allow a precise diagnosis of the new genus *Notoparmelia*. Seventeen new combinations are proposed.

4) Finally, we have studied the particular case of the common lichen *Pseudevernia furfuracea* that can present three different reproductive strategies. In addition to the morphs with sexual strategy (apothecia formation), the main form of asexual propagation is by isidia but some individuals with soredia have also been documented from different geographical areas. Morphological, chemical and molecular analyses of sorediate specimens from the Canary Islands, Morocco and Turkey were performed. The phylogenetic position of these samples in the global phylogeny of *Pseudevernia* was analyzed. It is the first time that the phylogeny of this genus has been constructed. The results showed two sister monophyletic groups, one including three American species and another one with all the samples of *P. furfuracea*. In the latter group no correlation was found between different reproductive strategies, different chemotypes or molecular variability. Based on those results we consider that all specimens fall within the variability of a single species, *P. furfuracea*. We discuss the biological and taxonomic importance of soralia, and the inadequacy of their presence/absence for segregating species (in the species pair concept). We propose the revision of other taxa, where the presence / absence of soralia has been used as a diagnostic character to distinguish species.

The results of the present investigation leads to the conclusion that *Parmeliaceae* (the largest family of lichenized fungi with more than 2000 species) shares unique synapomorphic characters of the ascoma: the type of ontogeny and a characteristic anatomical structure, called a cupulate proper exciple. In addition, the results highlight that the increasing amount of molecular data in the modern molecular era does not diminish the importance of morphological, ultrastructural and ontogenic comparative studies, especially of reproductive characters. In parallel with phylogenetic studies based on molecular data, it is important to seek new morphological characters, and to evaluate all available (new and old) information. This approach will allow the establishment of a well-grounded systematic based on phylogenetic relationships, and build a useful classification for the scientific community and biodiversity managers.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Los líquenes (hongos liquenizados)

Los líquenes son un grupo de hongos con una forma de nutrición especializada mediante la asociación simbiótica con algas fotosintéticas o/y cianobacterias. Esta simbiosis entre el hongo y el alga ha dado lugar a la evolución de diferentes formas del organismo, que se puede observar tanto en la gran variabilidad morfológica del talo vegetativo y de los órganos reproductores, como en su adaptación a la vida en diversos ecosistemas y sustratos. Los líquenes no forman un grupo monofilético porque el proceso de la liquenización ha ocurrido hasta tres veces durante la evolución de los hongos (Gargas *et al.* 1995) y además en varios grupos independientes ha ocurrido una pérdida posterior de este estado simbiótico (Lutzoni *et al.* 2001).

Desde el descubrimiento de Schwendener (1867), de que los líquenes son hongos, hasta su incorporación a la sistemática de los hongos (Nannfeldt 1932, Santesson 1952) ha pasado casi un siglo. La clasificación de los hongos liquenizados no puede separarse de la de los hongos no liquenizados, la cual está basada principalmente en los caracteres derivados del ciclo sexual de su vida. Así la incorporación de los hongos liquenizados a la sistemática de los hongos dió lugar a estudios profundos de las estructuras relacionadas con la reproducción sexual del hongo (Nannfeldt 1932, Luttrell 1951). Pero intentar descubrir las relaciones filogenéticas entre los hongos liquenizados y no liquenizados, y entre los distintos grupos de líquenes basándose solo en los datos morfológicos y químicos ha resultado ser una tarea frustrante. Los análisis filogenéticos basados en datos moleculares han llegado a ser indispensables para la delimitación de los grupos evolutivos.

A finales de los años 80 y principio de los 90, la taxonomía y sistemática basada en los datos morfológicos y la filogenia molecular de los líquenes llevaron caminos más o menos separados. Los primeros trabajos basados en datos moleculares se concentraron a menudo en la reconstrucción de las relaciones filogenéticas sin considerar la evolución de los caracteres morfológicos ni reinterpretar críticamente su valor a la luz de los resultados moleculares. Esto ha cambiado profundamente en los últimos años: la mayoría de las reconstrucciones filogenéticas de los ascomicetes liquenizados está diseñada para contrastar la clasificación basada en los datos morfológicos con los resultado filogenéticos. Como resultado, el valor sistemático de los caracteres morfológicos en distintos grupos se comprende mucho mejor y la reconstrucción de la evolución de los caracteres ya existe para muchos grupos. Por otro lado los taxónomos tradicionales han podido utilizar los datos moleculares para resolver los numerosos problemas de la taxonomía clásica de los líquenes, que sólo los datos independientes de los análisis moleculares pueden resolver. Uno de los problemas obvios, que

es relativamente fácil de resolver con los datos moleculares es la ubicación sistemática de los líquenes estériles (Stenroos & DePriest 1998; Arup & Grube 1999; Platt & Spatafora 2000; Ekman & Tønsberg 2002; Crespo *et al.* 2004b - Anexo III), o de las especies con dudosa ubicación sistemática (p. ej. Printzen & Kantvilas 2004; Lücking *et al.* 2007). Otro problema parecido proviene de las descripciones de las especies morfológicamente variables, de la dudosa circunscripción de los taxones y la asignación errónea de las especies a ellos, o de una interpretación errónea del valor sistemático de los caracteres debido a las incorrectas hipótesis de homología. En todos estos casos, los análisis moleculares ofrecen herramientas prometedoras para validar o refutar las hipótesis tradicionales y ofrecen la oportunidad para la evaluación crítica de la utilidad de los datos morfológicos y/o químicos en la sistemática de los líquenes.

Actualmente la mayoría de los árboles evolutivos están basados en las secuencias de ADN. Pero el creciente número de datos moleculares no resta valor ni importancia al estudio de otros caracteres (morfológicos, ultraestructurales, ontogenéticos).

2. El carácter taxonómico

Se define como carácter taxonómico "la característica de un organismo al que es posible atribuir por lo menos dos estados o condiciones y así puede ser utilizado para la reconstrucción de la clasificación y para otras actividades asociadas, principalmente su identificación" (Stuessy 2009). Puede servir para distinguir individuos o taxones de rangos inferiores (especies, géneros) o rangos superiores (familias, órdenes, clases, filos). El carácter ideal tiene que estar presente (expresarse) en gran número de individuos y su variabilidad debería permitir la agrupación y denominación de los individuos como taxones separados sea del rango que sea. Los caracteres son particularmente de mucho valor cuando se expresan siempre y además son filogenéticamente informativos, y su variabilidad puede ser utilizada para proponer hipótesis evolutivas.

Los taxónomos de hoy tienen muchos más caracteres a su alcance, como nunca antes, para poder formular hipótesis sobre las relaciones entre los organismos: pueden utilizar caracteres ultraestructurales, ontogénicos, químicos, bioquímicos y moleculares. Estos caracteres junto con los tradicionales morfológicos tienen el potencial para refinar la reorganización de los taxones de modo que refleje mejor su filogenia (Hawksworth 1994). A pesar de ello, la mayoría de los caracteres no-moleculares solo puede utilizarse para un número limitado de taxones relacionados y no puede aplicarse para todo el filo Ascomycota en conjunto (Grube & Hawksworth 2007).

Uno de los problemas que los taxónomos tienen que afrontar, especialmente cuando se utilizan datos morfológicos, es que estos pueden formar un continuo o solaparse, y por ello no pueden utilizarse por sí solos para la clara delimitación entre los taxones (Prieto *et al.* 2004). Además, la homología entre los estados de los caracteres, dentro y entre distintos grupos, es muchas veces difícil de asignar. Incluso la diferente interpretación de las mismas observaciones puede llevar a conclusiones sin consenso entre diferentes autores (p.ej. Feige & Lumbsch 1998, Lumbsch *et al.* 1991, Jahns *et al.* 1995).

Lo más importante a la hora de clasificar es no atribuir *a priori* mucho peso taxonómico a un carácter, sino que obtener el valor predictivo del carácter *a posteriori* basándose en los análisis filogenéticos moleculares, y describir los grupos con las posibles variabilidades de los caracteres morfológicos, anatómicos y químicos (Ekman *et al.* 2008, Crespo & Pérez-Ortega 2009). Una interpretación crítica de los resultados moleculares implica un buen conocimiento de la anatomía, la morfología y la química de los grupos taxonómicos estudiados (Printzen 2010). Por ello a menudo se utiliza un enfoque basado en caracteres, en el cual las hipótesis tradicionales sobre la homología de ciertos caracteres se confrontan con los resultados moleculares.

El reconocimiento de buenos caracteres para la clasificación ha sido inadecuado durante mucho tiempo por falta de medios técnicos y porque los caracteres seleccionados no reflejaban necesariamente los cambios evolutivos. El criterio básico en los principios de la sistemática y clasificación en familias de los hongos liquenizados fue la forma del crecimiento de talo y la forma del cuerpo fructífero, simplemente por ser caracteres fáciles de evaluar a simple vista (Linnaeus 1753, Acharius 1789, 1803, Nylander 1861). A pesar de tener a su disposición técnicas microscópicas en el siglo XIX, los autores siguieron utilizando los caracteres macromorfológicos como principales y los caracteres microscópicos (en su mayoría caracteres de las esporas) como adicionales (p.ej. Massalonge 1852, Körber 1854-1855, Fries 1861, Müller Argoviensis 1862, Stizenberger 1862). Con las herramientas moleculares se ha mostrado repetidamente la gran variabilidad de la forma del talo en cualquier grupo natural y que los líquenes con talos crustáceos, foliáceos y fruticulosos pueden existir dentro de la misma familia, p.ej. *Parmeliaceae* (Crespo *et al.* 2007), *Physciaceae* (Arup & Grube 1999), *Teloschistaceae* (Gaya *et al.* 2003, 2008). Igualmente se ha visto que los grupos basados en los distintos tipos de los cuerpos fructíferos, tales como *Discomycetes* (con apotecios), *Pyrenomycetes* (con peritecios), *Dothidiomycetes* (con cleistotecios), son para- o polifiléticos (Lumbsch 2000, Lumbsch *et al.* 2002).

Los caracteres anatómicos del talo y la presencia de diferentes órganos vegetativos (rizinas, cilios, lóbulos secundarios, pseudocifelas) aportan información para la delimitación de los géneros foliáceos y fruticulosos (Hale 1984a). Pero al igual que los caracteres mencionados

en el párrafo anterior no son sinapomórficos en la familia (Thomas *et al.* 2002, Stenroos *et al.* 2003, Crespo *et al.* 2007), aunque su estado puede ser un buen carácter diagnóstico de algunos géneros, p.ej. *Punctelia*, *Nipponoparmelia* (Crespo *et al.* 2010b).

2.1. Los caracteres reproductores

Aquí presentamos un resumen de los caracteres relacionados con la reproducción. De ellos, los que derivan del ciclo sexual son los que más peso deberían tener en la clasificación de los hongos liquenizados. Primero, porque son los caracteres básicos en la sistemática de los hongos y segundo, porque se les considera menos influenciados por el ambiente. Además forman un conjunto muy complejo de caracteres del cual se puede evaluar no solamente la morfología, sino la ultraestructura y ontogenia de las estructuras. En cada carácter repasamos lo que los estudios moleculares han contribuido a su interpretación.

Los líquenes utilizan dos estrategias diferentes para su reproducción y dispersión: (a) la reproducción sexual, mediante la producción de esporas que son exclusivamente fúngicas y que, por tanto, tienen que encontrar el fotobionte adecuado para establecer el nuevo liquen, y (b) la reproducción asexual basada en la diseminación de propágulos vegetativos simbióticos (compuestos por el foto y micobionte), tales como isidios, soredios u otros.

2.1.1. Reproducción sexual

Los caracteres derivados del ciclo sexual de los ascomicetes liquenizados son:

El aparato ascogonial

La fecundación

Los conidios / picnidios (en la medida en que los conidios pudieran ser vectores fecundantes y los picnidios órganos espermatógenos)

El aparato ascógeno

Los ascos

Las esporas

Las envolturas estériles

El cuerpo fructífero

El aparato ascogonial

El aparato ascogonial se conoce en los líquenes desde finales del siglo XIX (Stahl 1877) y ha sido visto y documentado en casi todos los trabajos sobre el desarrollo del ascoma (p.ej. Lindau 1888, Baur 1901, 1904, Letrouit Galinou 1970, Henssen & Jahns 1974). Este aparato tiene la misma estructura en casi todas las especies aunque con pequeñas variaciones (Bellemère & Letrouit-Galinou 1988). Consiste en una estructura filamentosa, generalmente formada por varias hifas ascogoniales con el citoplasma denso y teñido más intensamente que las hifas vegetativas de alrededor. Su base está formada por un glomérulo alargado de filamentos entrelazados, de los cuales salen unas prolongaciones rectas, las tricóginas. Los ápices de las tricóginas son más o menos erguidos y salen a la superficie del talo (Jahns 1973, 1978). En general, los ascogonios se producen en grupos (Baur 1904), muy raramente solos (Stahl 1877, Baur 1898), en la parte superior del talo. En los líquenes heterómeros se producen en la médula o en el borde entre la médula y la capa algal (Smith 1921, Henssen 1981). En *Parmeliaceae* aparecen siempre por encima de la capa algal, en la capa inferior del córtex (Lindau 1888, Baur 1904, Rosendhal 1907; **Capítulo I**). Los ascogonios se forman directamente a partir de las hifas del talo pero no se conoce el proceso o la señal que dispara su formación.

Este aparato ha sido documentado en muchas especies, pero ni su forma ni la zona donde aparece se ha relacionado con la sistemática. En la presente memoria doctoral, la zona del origen de los ascogonios se destaca como el factor responsable de la formación específica de la estructura del apotecio parmeliáceo (**Capítulo I**).

La fecundación

A pesar de que esta circunstancia no está referenciada de forma precisa en la literatura científica moderna, el proceso de fecundación se intuye desde las observaciones realizadas a finales del siglo XIX (p.ej. Stahl 1877, Borzi 1878, Lindau 1888). En las aportaciones científicas posteriores escritas en inglés no se han discutido suficientemente las interpretaciones muy detalladas de estos autores que se expresaban en sus lenguas vernáculas. Así, se observaron conidios adheridos a las paredes de la tricógina y la teoría de Stahl (1877) supone que las tricóginas son los receptores femeninos de los espermacios masculinos, proceso confirmado un siglo después con el microscopio de barrido por Honegger (1984). Aunque en este trabajo ya se describe la presencia del agujero redondo producido después de la entrada del conidio en la tricógina, hasta ahora no se ha mostrado el traspaso del núcleo por falta de estudios cariológicos en los hongos liquenizados. También se ha sugerido que las tricóginas pueden ser fecundadas por las hifas vegetativas del talo, según las observaciones de Bachmann

(1913) en *Collema*. Hasta ahora, no se ha encontrado variabilidad con importancia taxonómica en este carácter funcional.

Los conidios / picnidios

Los conidios son corpúsculos unicelulares de forma variable y hialinos, que se forman en gran cantidad en los picnidios; éstos son pequeños órganos de forma globular o piriformes hundidos en el talo, abiertos por un simple poro y observables en la superficie del talo como puntos marrones o negros. A lo largo de la historia no se ha prestado mucha atención a estos órganos. Unos de los pocos liquenólogos que consideró la estructura de los picnidios, su posición en el talo, y la forma y tamaño de los conidios como un carácter importante a nivel del género para la sistemática de los líquenes fue Nylander (1861). Después de la principal investigación de los tipos de picnidios y conidios realizada por Glück (1899) y mejorada por Steiner (1901) tuvo que pasar casi un siglo hasta que Vobis (1980) retomara el tema en el estudio comparativo de estos órganos.

A los conidios se les atribuyeron varias funciones: (a) asexual, como diásporas vegetativas que dan origen al nuevo micelio (p.ej. Möller 1887, Vobis 1977) y (b) sexual, como espermacios que fertilizan el ascogonio (p.ej. Stahl 1877, Baur 1904, Honegger 1984). Para no discriminar su función, Hawksworth (1988) propuso utilizar el término neutro, conidio (en vez de picnoespora o espermacio). En todo caso persiste la ambigüedad en cuanto a su funcionalidad en los líquenes.

La forma del conidio se ha utilizado como carácter para diagnosticar algunos géneros de *Parmeliaceae* (Krog, 1982b; Hale, 1974), *Physciaceae* (Poelt, 1965; Moberg, 1977) o *Thelotre mataceae* (Matsumoto & Deguchi, 1999). Algunos estudios (Hawksworth pers. comm.) sugieren que, en más de un caso, las formas no han sido bien descritas ya que la visualización no es sencilla debido a su estructura y dimensiones. También se ha confirmado (Ferencova, ined.) la importancia de estudiar este carácter con el microscopio electrónico de barrido que permite una mejor visualización de las formas comparado con el microscopio óptico, donde por su tamaño (desde 4 µm de largo y alrededor de 1 µm ancho) están en la frontera de la buena resolución. Es importante describir bien las categorías basadas en las formas y tamaño y luego contrastarlas con los resultados filogenéticos para poder estudiar la evolución del dicho carácter.

Aparato ascógeno

El aparato ascógeno está compuesto por todas las hifas que se originan en los ascogonios y que después de la fecundación crecen y se ramifican formando las hifas ascógenas dicarióticas, que darán origen a los ascos. La formación de los ascos en hongos liquenizados se supone que sigue los mismos pasos que en los no liquenizados. En un punto de la hifa ascógena se produce el uncínulo ("hook") y así después de su formación y de la fusión de dos núcleos haploides se forman las células terminales diploides, los ascos.

Aunque este aparato fue visto en algunas especies (Chadefaud 1960, Erbsich 1969) ha sido muy poco estudiado y los pocos casos conocidos en detalle no siempre coinciden con el modelo general.

Los ascos

El valor sistemático de la anatomía del asco ha sido muy discutido. El tipo del asco fue considerado como un carácter sistemático muy importante en la segunda mitad del siglo XX. Aunque de Bary (1884) le prestó atención ya en el siglo XIX, no fue hasta el año 1951 que Luttrell demostró por primera vez la variabilidad de la estructura de la pared del asco y definió los ascos unitunicados y bitunicados. Luego, se descubrió que las estructuras apicales del asco también presentan variabilidad y se describieron otros tipos de asco basándose en ellas (p. ej. Chadefaud *et al.* 1963, Chadefaud 1964). Pero la clasificación basada en las observaciones de esta estructura con microscopio óptico no fue clara para otros autores y sus interpretaciones no coincidieron. Una mejor interpretación de las observaciones llega con la utilización del microscopio electrónico de transmisión (Honegger 1978, 1980, 1982).

Desde la década de los años 80 del siglo XX, la estructura apical del asco ha ganado mucha importancia en la clasificación de Lecanoromycetes y en la delimitación de los grupos naturales (Hafellner 1984, Hawksworth 1994). La sistemática de Lecanorales sugerida por Rambold & Triebel (1992) se basó principalmente en similitudes en el tipo de asco pero con la llegada de las herramientas moleculares estas clasificaciones han recibido muchas críticas (Ekman & Wedin 2000, Lumbsch *et al.* 2001, Ekman *et al.* 2008). A la luz de los análisis filogenéticos basados en datos moleculares, algunas familias del orden Lecanorales son homogéneas y otras heterogéneas en relación con el tipo del asco. Se ha señalado que los distintos tipos de ascos inoperculados (prototunicados, unitunicados, bitunicados) parecen ser altamente homoplásicos (Lumbsch 2000; Lumbsch *et al.* 2002) y que en cada uno de los tipos de asco ocurren ligeras variaciones (Ekman *et al.* 2008). Así podemos encontrar ascos anatómicamente parecidos en grupos no relacionados, y las familias y/o géneros, que fueron

clasificados en distintos subórdenes según el tipo del asco pueden estar de hecho estrechamente relacionados. Por ejemplo, el asco tipo Lecanora se encuentra en *Lecanora* (*Lecanoraceae*), *Rinodina* (*Physciaceae*, Rambold *et al.* 1994) y *Pleopsidium* (*Acarosporaceae*), mientras que las familias relacionadas como *Ramalinaceae* y *Pilocarpaceae* (Andersen & Ekman 2005) muestran tipos de asco muy diferentes.

La variabilidad de la estructura del asco se basa en las diferencias de la estructura de la pared, de las estructuras apicales y del modo de dehiscencia del asco a la hora de liberar las esporas. Este carácter se aplica para distinguir los órdenes, familias, géneros y en muchos casos especies. Pero los grupos filogenéticos basados solamente en este carácter son en su mayoría polifiléticos (Grube & Hawksworth 2007).

El estudio del asco requiere mucho apoyo técnico (microscopio electrónico de transmisión), y la observación de distintos estados en muchas especies para poder establecer la homología de las estructuras. Sólo teniendo en cuenta la ontogenia, la función en el proceso de liberación de las esporas y la reacción química de las estructuras apicales se le puede atribuir al asco importancia sistemática como carácter diagnóstico de un grupo limitado. Es decir es un carácter que no se puede utilizar en sistemática de forma demasiado esquemática.

Las ascósporas

Las ascósporas se desarrollan dentro de la célula ascal por compartimentación del citoplasma ascal alrededor de los ocho núcleos originados por una meiosis y una mitosis. El proceso de ascosporogénesis está explicado en el **Capítulo II**.

La importancia de las ascósporas como carácter comenzó con la utilización del microscopio. Desde mediados del siglo XIX, la morfología de las ascosporas se convirtió en uno de los caracteres principales utilizados para describir géneros y familias en muchos grupos de hongos, incluyendo los líquenes (Körber 1855, 1865; Vainio 1890, Zahlbruckner 1926). Aunque los caracteres esporales suelen ser más o menos homogéneos dentro del género (p.ej. pluriseptadas, hialinas y alargadas en *Bacidia*; o grandes, unicelulares y con paredes muy anchas en *Pertusaria*), los resultados moleculares indican que la mayoría de los tipos ha evolucionado varias veces de forma independiente en los Lecanoromycetes o Euascomycetes en general, y constituyen un carácter fuertemente homoplásico (Ihlen & Ekman 2002; Helms *et al.* 2003; del Prado *et al.* 2006; Frisch *et al.* 2006; Lumbsch *et al.* 2006; Miadlikowska *et al.* 2006; Staiger *et al.* 2006; Gueidan *et al.* 2007; Savic *et al.* 2008). Por lo tanto, los caracteres de las ascósporas por lo general no reflejan las relaciones filogenéticas, aunque puedan ser útiles para describir ciertos taxones o grupos monofiléticos (p.ej. *Xanthoparmelia*, **Capítulo III**).

El tamaño de la ascóspora depende del número de esporas por asco, de la forma y del tamaño del asco. Como regla general, el tamaño de la ascóspora tiene valor para la identificación a nivel de especie o grupo de especies. Existen incluso algunos géneros, donde el tamaño de la espora varía muy poco (p.ej. *Xanthoparmelia*, *Parmelina*). Hay tendencias como que la reducción del número de ascósporas esté relacionada con el incremento del tamaño de éstas y eso suele ser específico a nivel de género (p.ej. *Partusaria*, Dibben 1982). El número más común de esporas por asco es ocho aunque existen desviaciones en varias familias (p.ej. *Candelariaceae*, *Acarosporaceae*) y pueden variar entre doce, dieciséis, 24, 32 o más. Ha sido mostrado, que la polisporia evolucionó por lo menos cuatro veces de forma independiente dentro de Lecanoromycetes (Reeb *et al.* 2004). En los ascos polispóricos, el tamaño de la espora tiende a disminuir (Hawksworth 1994). También se ha observado reducción del número de esporas a una o dos por asco, lo que suele estar relacionado con el incremento de su tamaño (p.ej. *Anzia*, *Sulcaria*, *Menegazzia*, *Pertusaria*). (Hawksworth 1994) El número de esporas por el asco puede servir como un buen carácter para separar algunas familias (*Candelariaceae*), géneros (*Sulcaria*) y especies en algunos casos (p.ej. *Lecanora cyrtella* y *L. sambucina*, Reese Næsborg *et al.* 2007).

La mayoría de las ascósporas son hialinas. Existen tendencias de analogía en varios géneros no relacionados a desarrollar esporas pigmentadas, en general marrones o negras, p.ej. *Physcia* (*Physciaceae*) y *Anzia* y *Alectoria* (*Parmeliaceae*). Es importante evaluar el estado de madurez de estas esporas, porque la pigmentación es un proceso ontogenético (Bellemère & Hafellner 1983, Nordin 1997).

El valor de la septación y del número de células por espora no puede ser categóricamente establecido. Existen grupos bien definidos para dicho carácter (p.ej. *Teloschistaceae*, *Ramalinaceae*), pero por otro lado hay grupos, donde estas características varían entre géneros (p.ej. *Parmeliaceae*) o dentro del género (*Bacidia*, *Rhizocarpon*).

La pared esporal ha recibido poca atención a pesar de que su ultraestructura puede mostrar caracteres importantes. Un estudio comparativo de especies se ha llevado al cabo en Caliciales (Tibell 1971), *Teloschistaceae*, *Physciaceae* (Nordin 1997) y *Parmeliaceae* (**Capítulo II**). La ornamentación de las ascósporas es muy rara en hongos liquenizados. Donde más se ha utilizado es en Caliciales como carácter específico de especies (Tibell 1971) o en *Physciaceae* (Nordin 1997).

Las envolturas estériles

El tejido vegetativo que se forma alrededor de las hifas ascógenas en el primordio formará todo el aparato estéril del futuro apotecio, las paráfisis y el excípulo (**Capítulo I**). Este aparato se origina en las hifas somáticas adjuntas al ascogonio (Henssen 1981) o en las células basales del ascogonio en *Collema* (Baur 1899). Se han descrito muchos tipos de desarrollo de este tejido incluso se ha propuesto terminología complicada para poder describir las distintas partes del primordio (Letrouit-Galinou 1968). El problema es que entre los distintos grupos no relacionados es muy difícil establecer la homología entre las estructuras observadas. Por eso aconsejamos estudiar su desarrollo en un grupo filogenéticamente bien delimitado como en el presente trabajo (**Capítulo I**).

El cuerpo fructífero

En la actualidad parece que ninguno de los tipos de ascoma, ni la ontogenia pueden ser utilizados para definir los principales linajes de los ascomicetes liquenizados (Lutzoni *et al.* 2004) debido por una parte a su historia evolutiva y a que no forman un grupo monofilético. Los resultados moleculares reunidos hasta ahora indican, que los apotecios son plesiomórficos entre los ascomicetes filamentosos y que los cleistotecios y peritecios son homoplásicos (Lumbsch 2000; Lumbsch *et al.* 2002).

El ejemplo del "orden" Caliciales ilustra muy bien como las similitudes en la morfología del ascoma pueden resultar engañosas cuando se trata de delimitar los taxones superiores en los líquenes. Caliciales parecía estar bien caracterizado por los apotecios pedunculados en su mayoría, con los ascos prototunicados formando un macedio. Sin embargo, diversos autores han mostrado que el grupo es polifilético (Wedin & Tibell 1997; Tibell & Wedin 2000; Wedin *et al.* 2000; Lumbsch *et al.* 2004, 2009).

2.1.2 Reproducción asexual

Un gran número de grupos de hongos liquenizados produce estructuras de reproducción asexual (Büdel & Scheidegger 1996), y para muchas especies es el modo más común de dispersión. La reproducción asexual en líquenes ha permitido su distribución global extensa, su invasión rápida de nuevos hábitats y su dominancia local en ambientes favorables (Bowler & Rundel 1975). Mientras muchos de los géneros crustáceos dependen de mecanismos sexuales, los líquenes fruticulosos y foliáceos tienden a presentar más propágulos asexuales (Bowler & Rundel 1975). De esta manera previenen el problema de encontrar el fotobionte compatible para restablecer la simbiosis (Walser *et al.* 2001). Las especies fruticulosas y foliáceas con

estrategias vegetativas suelen tener una distribución mundial mayor que las especies sexuales. En los líquenes crustáceos no se ha encontrado ningún patrón parecido (Poelt 1970).

Los propágulos vegetativos especializados más comunes son isidios y soredios. A parte de estos dos modos, la fragmentación del talo permite también la dispersión de muchos líquenes.

Isidios

Los isidios son pequeñas protuberancias a modo de evaginaciones talinas de forma variable en la superficie superior del talo. Están formados por unas pocas células del alga circundadas por hifas del micobionte y recubiertas por el córtex, como el resto de la cara del talo donde se hallan.

El papel que juegan los isidios en la biología de los líquenes se ha investigado en varias direcciones. Se supone que no sirven para la dispersión a largas distancias ya que son propágulos mucho más grandes que las ascosporas y los soredios. También se ha documentado que se fijan con dificultad al sustrato por lo que no sirven de buenos pioneros en la colonización de nuevos sitios (Jahns 1984, Kärnefelt 1990, Scheidegger *et al.* 1995).

La presencia de los isidios se ha relacionado además con un incremento de la superficie absorbente del talo (Crespo *et al.* 2004a), aumento en la retención de agua (Jahns 1984, Rikkinen 1997, Tretiach *et al.* 2005), incremento de la actividad metabólica (Tretiach *et al.* 2005) y/o como elementos de protección de la superficie frente a la radiación intensa (Kershaw 1983, Coxson *et al.* 1984).

Soredios

Los soredios son paquetes microscópicos formados por una o más células del fotobionte envueltas por hifas del micobionte. Típicamente los soredios no están corticados. Se forman en los sorolios, pequeñas depresiones o aperturas que rompen el córtex de la superficie del talo con formas diversas. Los soredios tienen consistencia pulverulenta o farinácea lo que les hace ligeros de peso, facilitando su dispersión por el viento o cualquier otro vector (aire, agua, insectos y otros animales) incluso a largas distancias.

Los propágulos vegetativos no se dispersan por ningún mecanismo activo sino que dependen de las fuerzas externas para ser separados del talo. Se ha demostrado experimentalmente que los soredios se desprenden del talo mediante el viento y las gotas de

agua (Brodie & Gregory 1953, Armstrong 1987, 1991, 1992, 1994). También se ha descrito su posible dispersión por los animales a distancias cortas (Bailey 1966, Bailey 1970, Stubbs 1995, Lorentsson & Mattsson 1999) y medianas (Bailey & James 1979). La gran área de distribución de algunas especies confirma el éxito de la dispersión mediante propágulos vegetativos (p.ej. Crespo *et al.* 2002).

El concepto "par de especies"

Además de describir las especies basándose en la presencia o ausencia de las estructuras reproductoras (Nylander 1861), se crearon unos rangos taxonómicos intermedios entre especie y género, agrupando dos o tres especies morfológicamente similares, en las que una de ellas se propaga sexualmente, mientras que la(s) otra(s) usa(n) diferentes modos de propagación vegetativa. Eso llevó a crear el término "pares de especies" (Du Rietz 1924). Este concepto de especies emparentadas pero con distintas estrategias reproductivas fue desarrollado por Poelt (1963, 1970) para especies epífitas foliáceas y fruticulosas de las zonas templadas del hemisferio norte y usando taxones típicamente simpátricos, al menos en algún sector de sus respectivas distribuciones. En las primeras descripciones se reconoce que en general el taxon sorediado presenta un área mayor y más abundante en biomasa. Este tema fue luego discutido en *Parmelia* s. lat. (Hale 1965) y en *Lobaria* (Yoshimura 1971). Los datos moleculares indican que las especies con diferentes estrategias reproductivas no son monofiléticas (p.ej. Lohtander *et al.* 1998a, 1998b; Myllys *et al.* 1999b, 2001; Articus *et al.* 2002; Molina *et al.* 2002; Ott *et al.* 2004; Tehler *et al.* 2004, 2010; Buschbom & Barker 2006; Buschbom & Müller 2006, Crespo & Pérez-Ortega 2009, **Capítulo VI**).

3. La familia *Parmeliaceae* (Lecanorales, Lecanoromycetes, Pezizomycotina, Ascomycota)

La familia *Parmeliaceae*, el objeto de la presente memoria doctoral, está constituida por un grupo de líquenes caracterizados por la morfología y ontogenia de su estructura de reproducción sexual: el apotecio. Como la inmensa mayoría de los líquenes (98%) se incluyen en el filo Ascomycota, que es el grupo más grande del reino Fungi. Dentro de Ascomycota el 40% de las especies han liquenizado, y la clase Lecanoromycetes, a la que pertenecen las parmeliáceas, es el grupo monofilético más numeroso en especies y casi exclusivamente liquenizado (Miadlikowska *et al.* 2006). Las parmeliáceas forman parte de la subclase Lecanoromycetidae (según Eriksson 2006), morfológicamente y químicamente diversa (Rambold & Hagedorn 1998) pero con un carácter en común, el mismo tipo de cuerpo

fructífero (de apotecio). En concreto se encuadran en el orden Lecanorales, caracterizado por presentar los apotecios con los ascos funcionalmente unitunicados y con una estructura compleja de su aparato apical.

Parmeliaceae es una de las mayores y mejor conocidas familias de hongos liquenizados, englobando más de 2000 especies organizadas en 86 géneros (Lumbsch & Huhndorf 2010). Sus representantes son en su mayoría macrolíquenes y presentan distintas formas de crecimiento. La mayoría de las especies son líquenes foliáceos (p.ej. *Parmelia*), fruticulosos (p.ej. *Pseudevernia*) y subfruticulosos (p.ej. *Cetraria*), pero también podemos encontrar umbilicados, peltados, subcrustáceos (p.ej. *Xanthoparmelia*). Además dentro de *Parmeliaceae* se incluye un género de hongos liquenícolas, *Nesolechia* (sin. *Phacopsis*).

Según los estudios moleculares constituye un grupo monofilético bien respaldado (Crespo *et al.* 2007) compuesto por varios linajes monofiléticos que representan diferentes grupos morfológicos - alectorioide, cetrarioide, hipogimnioide, letharioide, parmelioides, psiloparmelioides, usneoide (Crespo *et al.* 2007). Algunos de estos linajes equivaldrían a lo que ha sido considerado por diversos autores como familias separadas, *Alectoriaceae*, *Anziaceae*, *Cetrariaceae*, *Corniculariaceae*, *Everniaceae*, *Hypogymniaceae*, *Parmeliaceae* y *Usneaceae* (Eriksson & Hawksworth, 1998). El género *Protoparmelia* es el grupo hermano de las restantes parmeliáceas aunque su inclusión o exclusión en la familia *Parmeliaceae* aún presenta controversias. La familia monotípica *Gypsoplacaceae*, cuya descripción se basa en el desarrollo peculiar del cuerpo fructífero parece ser el grupo hermano más próximo del linaje “*Protoparmelia* + parmeliáceas” (Arup *et al.* 2007).

Este trabajo se centra en el grupo parmelioides, con cerca de 1500 especies (Lumbsch & Huhndorf 2010), que se ha definido con precisión después de contrastarse su carácter monofilético (Crespo *et al.* 2001, Crespo *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b). Cabe decir que este grupo se corresponde, si bien de forma no muy precisa, al concepto del género *Parmelia* de Acharius (*Parmelia* s. lat.). Se caracteriza por ser típicamente foliáceo con estructura dorsiventral, más o menos adnado, con apotecios y picnidios laminares, y por estar más o menos estrechamente unido al sustrato por rizinas. Es, con mucho, el grupo más amplio de la familia y con seguridad el grupo monofilético más extenso que se conoce en líquenes. Actualmente el grupo parmelioides está dividido en nueve clados monofiléticos principales (Crespo *et al.* 2010b), cada uno agrupando uno o más géneros. La circunscripción genérica ha sido objeto de gran debate en las últimas décadas y evaluada por los análisis moleculares (Blanco *et al.* 2004a, b, 2005; Divakar *et al.* 2006, 2010; Amo *et al.* 2010a, b; Crespo *et al.* 2010a, b).

A lo largo de la última década se ha llevado a cabo la reevaluación taxonómica de los géneros parmeliáceos utilizando como base las hipótesis filogenéticas inferidas a partir de los análisis moleculares (Blanco *et al.* 2004a, 2005, Divakar *et al.* 2006, Wirtz *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2007, 2010b, Amo *et al.* 2010). Además, los trabajos filogenéticos muestran que algunos géneros descritos sobre la base de unos pocos caracteres morfológicos y/o químicos son polifiléticos. Para resolver estos casos, hay que centrarse en caracteres micromorfológicos no estudiados hasta ahora. Por ejemplo, los caracteres micromorfológicos de los apotecios han sido ignorados por mucho tiempo en los líquenes parmelioides, basándose en el supuesto de que son uniformes dentro del grupo (excepto el tamaño de esporas, Elix 1993). Un buen número de trabajos recientes que forman esta memoria doctoral (**Capítulos III, IV y V**) indican que estos caracteres necesitan más atención que la que se les ha prestado hasta el momento.

Crespo *et al.* (2010b) presentan un trabajo sintético de la familia, reconstruyendo la filogenia de la misma con los datos moleculares. Reconocen 27 géneros parmelioides organizados en nueve clados monofiléticos principales. Cuatro de ellos son monogénicos y los otros cinco están compuestos por tres o más géneros. La relación entre los géneros dentro de cada clado está prácticamente resuelta (con la excepción del clado Hypotrachyna), pero no ocurre así con la relación entre los nueve clados principales, y alcanzar este objetivo requerirá seguramente la inclusión de más loci en los análisis filogenéticos (Crespo *et al.* 2010b).

La distribución de los caracteres morfológicos, anatómicos, químicos, ecológicos o biogeográficos hasta ahora empleados en la sistemática de los parmeliáceos no refleja la topología subfamiliar reconstruida con los datos moleculares (Crespo *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b). Por eso la investigación planteada en esta tesis busca encontrar nuevos caracteres y evaluar su valor taxonómico y filogenético, estudiando de manera comparada representantes de todos los clados parmelioides. Se eligieron los órganos de reproducción sexual por estar considerados como los caracteres con mayor validez e importancia en la taxonomía de los ascomicetes no liquenizados, y por estar menos influenciados por los factores ambientales que los caracteres vegetativos (Kärnefelt & Thell 1994).

3.1. Los caracteres reproductores en la sistemática de la familia *Parmeliaceae*

La clasificación tradicional de los líquenes parmeliáceos se apoya principalmente en los caracteres vegetativos, p.ej. tipo de córtex superior, estructuras superficiales de intercambio gaseoso, presencia y tipo de cilios y rizinas y/o caracteres químicos, p.ej. tipo de polisacárido presente en las paredes celulares, tipo de extrolitos (= metabolitos secundarios) (p.ej. Hale, 1974, 1984b, 1986a,b, 1988; Elix & Hale, 1987; Elix, 1993; Crespo *et al.* 1999; Divakar &

Upreti, 2005). La aceptación de los géneros basados sólo en estos caracteres, sin evaluar los caracteres ascomatales, ha sido controvertida (Poelt & Vezda 1981, Krog & Swinscow 1981, Clauzade & Roux 1986).

Los caracteres generativos, tan habitualmente utilizados en la taxonomía de otros hongos, se han empleado comúnmente solo en el caso de los líquenes crustáceos y otros microlíquenes. Sin embargo en los grupos foliáceos se han utilizado con menos frecuencia porque se consideraron bastante uniformes (Hale 1984a, Hafellner 1994). En los parmeliáceos han sido aún más infrautilizados especialmente en el caso de los parmelioides, donde un gran porcentaje de las especies descritas solo se conocen estériles o, al menos, el tipo es estéril (Crespo *et al.* 2011).

No obstante, algunos autores han hecho hincapié en la importancia de las estructuras reproductoras. Dado que la presente memoria doctoral se centra en las estructuras reproductoras como carácter adicional en la delimitación de los taxones parmeliáceos, a continuación se resumen estos estudios continuando el mismo esquema que en la parte general.

Aparato ascogonial

La estructura del aparato ascogonial fue mostrada en diferentes especies parmeliáceas por varios autores (Lindau 1888; Baur 1901, 1904; Letrouit-Galinou 1970; Henssen & Jahns 1974; Henssen 1981, 1991, 1992a, b, 1995; Henssen & Titze 1992; Jahns *et al.* 1995; Sojo *et al.* 2003) pero este carácter sólo ha sido indirectamente relacionado con la sistemática. Nosotros destacamos la zona precisa del talo en la que se originan los ascogonios como el factor responsable de la formación de la estructura singular y única del apotecio parmeliáceo y presentamos un estudio detallado de su variabilidad (**Capítulo I**).

La fecundación

La fecundación no ha sido observada en ninguna especie de *Parmeliaceae* hasta ahora.

Conidios

La forma del conidio, se ha utilizado para segregar algunos géneros como *Punctelia* (Krog, 1982b) y *Relicina* (Hale, 1974) y la delimitación de estos géneros ha sido confirmado con análisis moleculares (Crespo *et al.* 2007). En el clado cetrarioide fueron descritos cinco tipos principales (Thell 1995) pero han mostrado ser homoplásicos.

Igual que ocurre con las ascósporas, al no estar presentes las conidiósporas de manera regular, este carácter puede haber sido subestimado. Sin embargo, hay autores que destacan su importancia en *Parmelia* s. lat. (Elix, 1993). Sea como fuere, su variabilidad y valor filogenético podrá ser replanteado a la luz de los grupos monofiléticos definidos por los tratamientos moleculares.

La posición de los picnidios se ha utilizado para distinguir los géneros parmelioides (laminares) de los cetrarioides (marginales), pero se ha visto que este carácter es plesiomórfico en algunas especies de *Parmotrema* y *Cetrelia* (Crespo *et al.* 2010b). Por otra parte, el desarrollo de los conidios se ha utilizado para diferenciar géneros con conidios tipo Psora, con desarrollo exobasidial (por ejemplo en *Parmeliopsis*) de géneros con conidios tipo *Parmelia* (endobasidial). No hay más datos al respecto.

Aparato ascogonial

No ha sido estudiado en detalle ni se ha utilizado en relación con la taxonomía.

Ascos

El tipo de asco fue relacionado con la sistemática de los líquenes cetrarioides (Kärnefelt *et al.* 1992, 1993). Se distinguieron ocho formas distintas de asco del tipo Lecanora en líquenes parmeliáceos (Thell *et al.* 1995). En los parmelioides, este carácter se ha considerado más homogéneo, distinguiéndose sólo dos formas de asco del tipo Lecanora que no se han podido relacionar con grupos monofiléticos. Existe una estrecha relación positiva entre el tamaño de las esporas y del asco como se muestra en el **Capítulo II**. Además el estudio de este carácter parece complicado por la necesidad de comparar ascos en el mismo estado de desarrollo y por la interpretación difícil y subjetiva de las diferencias entre los distintos tipos. Se necesita mucha experiencia y conocimiento de los distintos tipos para poder atribuir con seguridad el tipo.

Ascósporas

Los caracteres de las esporas han recibido poco reconocimiento en los estudios taxonómicos de los líquenes parmelioides, aunque ya Massalongo (1852) utilizó las esporas como un carácter más para establecer los géneros, muchos de ellos aún válidos. Posteriormente han sido empleados por diversos autores. Ahti (1966) les atribuyó importancia como carácter

específico. Su tamaño y forma se consideraron con mucho valor a nivel genérico en *Parmeliaceae* (Elix 1993, 1994; Divakar & Upreti 2005). Cuanto más atención se les presta, más evidente resulta que los caracteres de las esporas son tan importantes en esta familia como en otros ascomicetes liquenizados y no liquenizados (Crespo *et al.* 2011). Por ejemplo, las esporas con paredes gruesas son típicas del género *Parmotrema* (Hale 1965), *Cetrelia* (Culberson & Culberson 1968), *Parmelia* (Hale 1987) y el vacuoma arachiforme está presente en todos los representantes del clado *Xanthoparmelia* (**Capítulo III**). Destacan los géneros *Anzia*, *Menegazzia*, *Oropogon* y *Sulcaria*, entre otros, por sus esporas desviantes respecto a las demás *Parmeliaceae* con ocho esporas hialinas, simples por asco. La ultraestructura de las esporas parmeliáceas no ha sido estudiada sistemáticamente hasta ahora por considerarse poco variables al ser lisas e hialinas. En el **Capítulo II** abordamos el estudio morfológico y ultraestructural detallado de las esporas de los parmeliáceos, mostrando su variabilidad tanto en dimensiones como en ultraestructura, y presentamos una tipología esporal basada en los principales caracteres.

Las envolturas estériles

Algunos autores han utilizado caracteres de las envolturas estériles como caracteres taxonómicos. Por ejemplo, Sincock (1982) en un trabajo inédito utilizó la microscopia electrónica de barrido como herramienta de análisis del valor taxonómico de la estructura interna del apotecio en 19 especies de la familia *Parmeliaceae*. Hawksworth (1988) propuso que las estructuras excipulares en el género *Xanthoparmelia* podrían servir como un carácter taxonómico. Nash *et al.* (1990) incluyeron la zona excipular como carácter complementario en el estudio de los líquenes umbilicados de esta familia. La estructura del apotecio en los géneros usneoides fue utilizada entre otros caracteres para rechazar la familia *Usneaceae* e incluir estos géneros en la familia *Parmeliaceae* (Kärnefelt *et al.* 1998). Las estructuras del hamatecio (la parte estéril del himenio) también han sido consideradas como muy importantes a nivel de la familia o del género (Kärnefelt & Thell 1994). En el **Capítulo I** estudiamos la estructura de excípulo propio de parmeliáceos y destacamos su importancia como carácter taxonómico.

Cuerpo fructífero

Todos los parmeliáceos presentan un tipo especial de apotecios lecanorinos con el llamativo excípulo propio. Su estructura esta descrita en el **Capítulo I** y lo denominamos apotecio parmeliáceo. Se reconocen cinco tipos diferentes y se muestra su valor diagnóstico para algunos géneros (**Capítulo IV y V**).

La posición de los apotecios en el talo ha sido utilizada en la adscripción de los géneros al grupo parmelioides (apotecios laminares) o cetrarioide (apotecios marginales o submarginales) aunque posteriormente este carácter ha sido considerado como sinapomórfico (Crespo *et al.* 2007) debido a que algunas especies de *Parmotrema* y *Cetrelia* con apotecios marginales pertenecen al clado parmelioides y las especies de *Melanelia* s. str. con apotecios laminares pertenecen al clado cetrarioide.

La presencia de discos perforados también ha contribuido a la segregación de géneros (Elix 1993) aunque estos han sido rechazados posteriormente (Blanco *et al.* 2005) y dicho carácter se ha encontrado en otros géneros no relacionados, p.ej. *Parmelia tenuirima* (Hale 1987), *Cetrelia* y *Platismatia* (Culberson & Culberson 1968).

Isidios

En general, en cada género o linaje monofilético de la familia *Parmeliaceae* predomina una de las estrategias vegetativas. Por ejemplo, los representantes de los géneros *Xanthoparmelia* (Hale 1990), *Melanelixia* (Blanco *et al.* 2004b), *Parmelina* (Hale 1976) *Pseudevernia* (Hale 1968) y *Platismatia* (Culberson & Culberson 1968) en su mayoría producen isidios.

Algunas observaciones sugieren que la aridez y radiación solar estimulan la diferenciación de propágulos corticados como los isidios. Así en la especie isidiada *Parmelia saxatilis*, la mayoría de los talos crece en sitios secos y rocosos expuestos al sol pero se han documentado talos con estructuras parecidas a los sorelios desarrollándose en los troncos de árboles a la sombra y con bastante humedad (Jahns 1984). El desarrollo de los isidios podría ser inducido por los factores ecológicos. Los isidios se suelen convertir en los lóbulos secundarios y así aumentar la superficie absorbente del talo. Incluso, de los lóbulos pueden llegar a desarrollarse los nuevos talos encima del talo pariente (Jahns 1984).

La presencia / ausencia de los isidios y su forma han sido tradicionalmente utilizados como un buen carácter para distinguir las especies. Pero en un trabajo reciente, Nuñez-Zapata *et al.* (2011) demostraron, que *Parmelina pastillifera* con los isidios abotonados y *P. tiliacea* con isidios cilíndricos son genéticamente muy próximos. El desarrollo de dos fenotipos tan diferentes y utilizados como carácter diagnóstico principal en su identificación podría estar influido por los factores ecológicos.

Sorelios

La producción de soredios en los líquenes es más frecuente que la producción de isidios (Bowler & Rundel 1975). Los soredios han sido considerados como los propágulos seleccionados durante la historia evolutiva de los líquenes (Poelt 1970, 1972) atribuyéndoles importancia como carácter taxonómico ya desde Nylander (1861) quien describió un gran número de especies en *Parmelia* basándose en su presencia o ausencia.

Igual que hay linajes predominantemente con las especies isidiadas (*Parmelina*), los hay con especies sorediadas como *Myelochroa*, *Parmotrema* y *Flavoparmelia* (Hale 1965), *Cetrelia* (Culberson & Culberson 1968). En casos menos comunes en el mismo género se presentan ambas opciones (*Punctelia*). Hale (1965) estudió este carácter y no encontró ninguna relación entre la presencia de los soredios y otros caracteres morfológicos o químicos en *Parmelia* subgénero *Amphigymnia*. Propuso que la producción de los isidios ocurre en un linaje separado y antiguo de este género y que todas las especies sorediadas en este grupo evolucionaron de antecesores isidiados o sexuales.

Se han encontrado casos de formación anómala de soredios dispersos en especies no sorediadas (Poelt 1973) y unos pocos ejemplos donde se desarrollan soredios e isidios a la vez, como *Platismatia glauca*, *P. norvegica* (Culberson & Culberson 1968) y *Pseudevernia furfuracea* (Hafellner & Obermayer 2004, **Capítulo VI**).

Aunque los isidios y soredios sirven muy bien como propágulos vegetativos para la dispersión del líquen, su inducción y producción podrían estar relacionadas con adaptaciones ecológicas a los parámetros ambientales; especialmente en el caso de los soredios. Algunas observaciones sugieren que la humedad y sombra inducen el desarrollo de los soredios, o estructuras parecidas a los soredios (Jahns 1984, Tehler *et al.* 2010). Las bases genéticas de la presencia de soredios en un talo son todavía desconocidas.

Concepto de "pares de especies"

El concepto de ‘pares de especies’ también ha sido empleado y discutido en parmeliáceas (Hale 1965). Después de aplicar las técnicas moleculares a esta problemática ha sido repetidamente mostrado que la especie sorediada y su especie par fértil no forman grupos genéticamente separados (Articus *et al.* 2002, Tehler *et al.* 2010, Miadlikowska *et al.* 2011, Wirtz *et al.* 2012), sino que son especies coespecíficas formando un taxón con diferentes modos de reproducción (Articus *et al.* 2002) o formando hasta seis taxones crípticos (Kroken & Taylor 2001). En el **Capítulo VI** abordamos este tema en profundidad.

OBJETIVOS

Para el estudio comparativo dentro de la familia *Parmeliaceae* se eligieron dos conjuntos de caracteres relacionados con la reproducción. Primero, las ascósporas, evaluando su tamaño, forma, contenido interno y ultraestructura de la pared. Segundo, el excípulo propio del apotecio, un carácter estructural del órgano reproductor, compuesto exclusivamente por hifas fúngicas, y de gran originalidad en esta familia. Para la selección del material de estudio se utilizó la hipótesis filogenética de la familia *Parmeliaceae*, reconstruida con los datos moleculares (Crespo *et al.* 2010b - Anexo I), con objeto de recoger el máximo de variabilidad e incluir todos los linajes evolutivos de la familia.

El objetivo general de memoria doctoral es:

1. Estudiar y evaluar la variabilidad de los caracteres seleccionados (ascósporas, excípulo propio) dentro de la familia *Parmeliaceae*, con especial énfasis en el clado parmeliode (**Capítulos I y II**).

Los objetivos específicos son:

2. Establecer los caracteres seleccionados como carácter diagnóstico de grupos monofiléticos de la familia, en concreto para el género *Xanthoparmelia* (**Capítulo III**).

3. Utilizar los caracteres seleccionados como caracteres adicionales en la delimitación de nuevos géneros monofiléticos, en concreto *Austroparmelina* (**Capítulo IV**) y *Notoparmelia* (**Capítulo V**).

4. Estudiar y discutir los modos de reproducción en *Pseudevernia furfuracea* un taxón con amplia distribución que puede presentar apotecios, isidios y soredios (**Capítulo VI**).

MATERIAL

Material utilizado

El material utilizado en este trabajo comparado consiste en muestras de líquenes de herbarios, principalmente del Herbario MAF-Lich, del Departamento de Biología Vegetal II (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid). Se analizaron detalladamente 161 especies distintas de líquenes. 132 de ellas pertenecientes al clado parmelioides de la familia *Parmeliaceae*, 18 de otros clados de la misma familia y once de otros géneros de Lecanoromycetes. De algunas especies se evaluaron varios especímenes. La información precisa de las muestras está en la Tabla 1. Se especifica en que capítulo han sido utilizados y el tipo de estudio realizado con cada espécimen (MO = Microscopia óptica, TEM = Microscopia electrónica de transmisión, AM = análisis moleculares, TLC = cromatografía de capa fina).

Tabla 1. Material utilizado.

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Arctoparmelia centrifuga</i>	MAF-Lich 9965	Sweden: Västerbotten	O.E.Eriksson	I, II	MO
<i>Austroparmelina conlabrosa</i>	Elix 38801	Australia: New South Wales	J.A.Elix	IV	AM
<i>Austroparmelina elixia</i>	MAF-Lich 13962	Australia: New South Wales	J.A.Elix	I, II, IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina endoleuca</i>	Elix 28812	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	I, II, III, IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina endoleuca</i>	Elix 28247	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	I, II, IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina endoleuca</i>	Elix 38802	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	IV	AM
<i>Austroparmelina endoleuca</i>	Elix 38805	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina labrosa</i>	Elix 28818	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	I, II, IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina labrosa</i>	s/n	South Africa: Eastern Cape	A.Crespo et al.	IV	AM
<i>Austroparmelina macrospora</i>	Elix 32408	Australia: Western Australia	J.A.Elix	I, II, IV	AM, MO
<i>Austroparmelina norpruinata</i>	MAF-Lich 15376	Australia: New South Wales	J.A.Elix	I, II, IV	AM, MO
<i>Austroparmelina pruinata</i>	MAF-Lich 14270	Australia: Western Australia	E. McCrum	I, II, III, IV	AM, MO
<i>Austroparmelina pseudorelicina</i>	Elix 28816	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	I, II, III, IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina pseudorelicina</i>	Elix 31846	Australia: Australian Capital Territory	J.A.Elix	I, II, IV	AM, MO, TEM
<i>Austroparmelina pseudorelicina</i>	MAF-Lich 16114	Australia: Australian Capital Territory	G.Amo & J.A.Elix	IV	AM
<i>Austroparmelina pseudorelicina</i>	MAF-Lich 16115	Australia: Australian Capital Territory	G.Amo & J.A.Elix	IV	AM
<i>Brodoa atrofusca</i>	MAF-Lich 11202	Spain: La Rioja	D.L.Hawksworth	I, II	MO
<i>Bulbothrix coronata</i>	MAF-Lich 13987	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II, III	MO, TEM
<i>Bulbothrix goebelii</i>	MAF-Lich 17011	Australia: Queensland	J.A.Elix	I, II	MO
<i>Bulbothrix isidiza</i>	MAF-Lich 15511	Congo: Kahuzi-Biega National Park	B.Mamush	I, II	MO
<i>Bulbothrix klementii</i>	MAF-Lich 17012	Costa Rica: Puntarenas	R.Lücking	I, II	MO, TEM
<i>Bulbothrix meizospora</i>	MAF-Lich 17013	India: Uttaraanchal	P.K.Divakar	I, II	MO, TEM
<i>Bulbothrix setschwanensis</i>	MAF-Lich 10212	China: Yunnan: Chu Xiong Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO, TEM
<i>Caloplaca cerina</i>	MAF-Lich 14017	Spain: Madrid	A.G.Bueno	I	MO
<i>Canoparmelia macrospora</i>	MAF-Lich 15508	South Africa: Eastern Cape	A.Crespo et al.	I, II	MO

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Canoparmelia texana</i>	A.Crespo 19566L	Kenya: Western Province	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Cetraria crespoe</i>	MAF-Lich 7061	Spain: Caceres	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Cetrariastrum andense</i>	MAF-Lich 15620	Peru: Ancash	T.Lumbsch et al.	I, II	MO
<i>Cetrariastrum ecuadoriense</i>	MAF-Lich 17014	Ecuador: Cotopaxi	Z.Palice	I, II	MO, TEM
<i>Crespoa crozalsiana</i>	MAF-Lich 11581	Spain: Cadiz	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Crespoa crozalsiana</i>	MAF-Lich 11584	Spain: Cadiz	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Crespoa inhaminensis</i>	BM 000731261	Mozambique	D.Jones Sosa	I, II	MO
<i>Crespoa schelpei</i>	LD 1047004	Mozambique: Inhambane	E.Schelpe	I, II	MO
<i>Emodomelanelia masonii</i>	MAF-Lich 17015	India: North Sikkim	P.K.Divakar	I, II	MO
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	MAF-Lich 7465	Costa Rica: San José	M.T.Trest	I, II, III	MO, TEM
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	MAF-Lich 7527	Costa Rica: San José	M.T.Trest	I, II	MO
<i>Everniastrum lipidiferum</i>	MAF-Lich 13966	Peru: Quebrada Cojup	T.H.Lumbsch	I, II	MO, TEM
<i>Everniastrum rhizodendroidum</i>	ABL: Aptroot 55665	China: Yunnan: Jianchuan Co.	Aptroot	I, II	MO, TEM
<i>Flavoparmelia caperata</i>	MAF-Lich 10364	Spain: Cadiz	A.Crespo et al.	I, II, III	MO, TEM
<i>Flavoparmelia diffractica</i>	MAF-Lich 15379	Australia: Western Australia	J.A.Elix	I, II	MO
<i>Flavoparmelia ferax</i>	MAF-Lich 15366	Australia: South Australia	J.A.Elix	I, II	MO, TEM
<i>Flavoparmelia haysomii</i>	MAF-Lich 9842	Australia: Australian Capital Territory	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II	MO
<i>Flavoparmelia marchantii</i>	MAF-Lich 10492	Australia: Western Australia	E.McCrum	I, II	MO
<i>Flavoparmelia rutidota</i>	MAF-Lich 15367	Australia: Western Australia	J.A.Elix	I, II	MO
<i>Flavoparmelia secalonica</i>	MAF-Lich 15368	Australia: Western Australia	J.A.Elix	I, II	MO
<i>Flavoparmelia virensica</i>	MAF-Lich 15369	Australia: Western Australia	J.A.Elix	I, II	MO
<i>Flavopunctelia darrowi</i>	MAF-Lich 6638	USA: Arizona: Cochise Co.	T.H.Nash	I, II	MO
<i>Flavopunctelia flaventior</i>	MAF-Lich 6531	USA: California: Monterey Co.	T.H.Nash	I, II, III	MO
<i>Hypogymnia sp.</i>	G.Amo 13c	Chile	G.Amo	I, II	MO
<i>Hypogymnia farinacea</i>	MAF-Lich 15592	Spain: Guadarrama	P.K.Divakar	V	AM
<i>Hypogymnia physodes</i>	MAF-Lich 12543	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	V	AM

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Hypogymnia wattiana</i>	MAF-Lich 17018	India: North Sikkim	P.K.Divakar	I, II	MO
<i>Hypotrachyna fissicarpa</i>	MAF-Lich 17020	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Hypotrachyna osseoalba</i>	MAF-Lich 10390	China: Yunnan: Chu Xiong Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Hypotrachyna physcioides</i>	MAF-Lich 10391	China: Yunnan: Dali Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO, TEM
<i>Hypotrachyna reducens</i>	MAF-Lich 17021	Costa Rica: Cartago	R.Lücking	I, II	MO
<i>Hypotrachyna revoluta</i>	MAF-Lich 13989	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II, III	MO, TEM
<i>Imshaugia aleurites</i>	MAF-Lich 6647	Mexico: Chihuahua	T.H.Nash	I, II	MO
<i>Lecanora muralis</i>	MAF-Lich 14705	Spain: Toledo	V.J.Rico	I, II	MO
<i>Lecanora subfuscata</i>	MAF-Lich 11888	Spain: La Coruña	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Lecidea berengeriana</i>	MAF-Lich 6492	USA: Colorado: Hindsale Co.	T.H.Nash	I	MO
<i>Lecidea fuscoatra</i>	MAF-Lich 15244	Portugal: Trás-os-Montes	V.J.Rico	I	MO
<i>Leptogium lichenoides</i>	MAF-Lich 5155	Germany: Bayern	R.Türk et al.	I	MO
<i>Melanelia conmixta</i>	MAF-Lich 10565	Spain: Segovia	V.J.Rico	I, II	MO
<i>Melanelia hepatizon</i>	MAF-Lich 6401	Austria: Salzburg	R.Türk	I, II	MO
<i>Melanelia panniformis</i>	MAF-Lich 3675	Norway: Nordland	L.G.Sancho	I, II	MO, TEM
<i>Melanelia stygia</i>	MAF-Lich 10522	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	I, II	MO, TEM
<i>Melanelia stygia</i>	MAF-Lich 7528	Finland: Enonkoski	V.Haikonen	I, II	MO, TEM
<i>Melanelia tominii</i>	MAF-Lich 17025	India: North Sikkim	P.K.Divakar	I, II	MO
<i>Melanelixia calva</i>	MAF-Lich 17022	New Zealand: South Island: Otago	A.Knight	I, II	MO
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	MAF-Lich 5654	Spain: Albacete	G.Aragón & V.J.Rico	I, II	MO, TEM
<i>Melanelixia glabra</i>	MAF-Lich 7634	Spain: Salamanca	D.L.Hawksworth	I, II, III	MO, TEM
<i>Melanelixia glabra</i>	MAF-Lich 11411	Spain: Madrid	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Melanelixia glabra</i>	MAF-Lich 13938	Spain: Toledo	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Melanelixia glabra</i>	MAF-Lich 14276	Spain: Caceres	A.Crespo et al.	I, II, III	MO
<i>Melanelixia glabratuloides</i>	MAF-Lich 17023	New Zealand: South Island: Otago	A.Knight	I, II	MO
<i>Melanelixia subaurifera</i>	MAF-Lich 10124	Spain: Madrid	V.J.Rico	I, II	MO

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Melanelixia subaurifera</i>	MAF-Lich 11404	Spain: Ciudad Real	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Melanohalea elegantula</i>	MAF-Lich 6493	USA: Nevada: White Pine Co.	T.H.Nash	I, II	MO, TEM
<i>Melanohalea exasperata</i>	MAF-Lich 7636	Spain: Cadiz	A.Crespo et al.	I, II, III	MO, TEM
<i>Melanohalea exasperata</i>	MAF-Lich 10214	Spain: Guadalajara	O.Blanco	I, II, III	MO
<i>Melanohalea olivacea</i>	MAF-Lich 7666	Finland: Poulanca	O.Vitikainen	I, II	MO
<i>Melanohalea subelegantula</i>	MAF-Lich 10953	USA: Oregon: Grant Co.	T.L.Esslinger	I, II	MO
<i>Melanohalea subolivacea</i>	MAF-Lich 10950	USA: Arizona: Cochise Co.	T.L.Esslinger	I, II	MO
<i>Melanohalea subolivacea</i>	MAF-Lich 10954	USA: Oregon: Wheeler Co.	T.L.Esslinger	I, II	MO
<i>Myelochroa aurulenta</i>	MAF-Lich 13992	India: North Sikkim	P.K.Divakar	I, II	MO
<i>Myelochroa galbiniana</i>	MAF-Lich 10414	China: Yunnan: Lijiang Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO, TEM
<i>Myelochroa irrugans</i>	MAF-Lich 10207	China: Yunnan	A.Crespo et al.	I, II, III	MO, TEM
<i>Nipponoparmelia laevior</i>	MAF-Lich 7278	Japan: Hokaido	H.Harada	I, II, V	MO, TEM
<i>Nipponoparmelia ricasolioides</i>	MAF-Lich 15526	China: Yunnan: Jian Chuan Co.	A.Crespo et al.	I, II, V	MO
<i>Notoparmelia crambidiocarpa</i>	MAF-Lich 4965	New Zealand: South Island: West Coast	H.A.Imshaug	I, II, V	MO, TEM
<i>Notoparmelia erumpens</i>	MAF-Lich 7529	Australia: Australian Capital Territory	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, V	MO, TEM
<i>Notoparmelia erumpens</i>	MAF-Lich 7576	Australia: New South Wales	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, V	MO
<i>Notoparmelia signifera</i>	MAF-Lich 7545	Australia: Australian Capital Territory	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, V	MO, TEM
<i>Notoparmelia subtestacea</i>	MAF-Lich 17026	New Zealand: South Island: Otago	A.Knight	I, II, V	MO
<i>Notoparmelia tenuirima</i>	MAF-Lich 17027	New Zealand: South Island: Southland	A.Knight	I, II, V	MO
<i>Notoparmelia tenuirima</i>	MAF-Lich 7663	New Zealand: South Island: West Coast	M.E.Hale	I, II, V	MO
<i>Parmelia adaugescens</i>	MAF-Lich 7277	Japan: Hokkaido	H.Harada	I, II, V	MO, TEM
<i>Parmelia adaugescens</i>	MAF-Lich 9870	Japan: Hokkaido	Miyawaki	I, II, V	MO
<i>Parmelia cochleata</i>	MAF-Lich 7280	Japan: Hokkaido	H.Harada	I, II, V	MO, TEM
<i>Parmelia fertilis</i>	MAF-Lich 9880	Japan: Hokkaido	Miyawaki	I, II, V	MO, TEM
<i>Parmelia omphalodes</i>	MAF-Lich 15485	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II, V	MO
<i>Parmelia omphalodes</i>	MAF-Lich 6798	Spain: Madrid	A.Crespo	I, II, V	MO, TEM

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Parmelia saxatilis</i>	MAF-Lich 11541	Spain: Cadiz	A.Crespo et al.	I, II, III, V	MO, TEM
<i>Parmelia saxatilis</i>	MAF-Lich 12518	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	I, II, III, V	MO, TEM
<i>Parmelia serrana</i>	MAF-Lich 13882	Spain: Madrid	A.Crespo	I, II, V	MO
<i>Parmelia sulcata</i>	MAF-Lich 13883	Spain: Madrid	A.Crespo	I, II, V	MO
<i>Parmelia sulcata</i>	MAF-Lich 15421	Ireland: Kerry Dunkerron	A.Crespo et al.	I, II, V	MO
<i>Parmelina atricha</i>	MAF-Lich 17028	France: Pirineos	A.Argüello	I, II, IV	MO
<i>Parmelina atricha</i>	MAF-Lich 16633	Spain: Gerona	A.Crespo et al.	I, II, IV	MO
<i>Parmelina atricha</i>	MAF-Lich 16634	France: Pirineos	A.Crespo et al.	I, II, IV	MO
<i>Parmelina carporrhizans</i>	MAF-Lich 7229	Spain: Badajoz	M.Pugh Jones	I, II, IV	MO
<i>Parmelina carporrhizans</i>	MAF-Lich 6057	Spain: Madrid	A.Crespo	I, II, IV	MO, TEM
<i>Parmelina carporrhizans</i>	MAF-Lich 13952	Spain: Tenerife	A.Crespo et al.	I, II, IV	MO
<i>Parmelina coleae</i>	MAF-Lich 13960	USA: California: Tehama Co.	M.S.Cole	I, II, IV	MO
<i>Parmelina quercina</i>	MAF-Lich 13949	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	I, II, III, IV	MO, TEM
<i>Parmelina quercina</i>	MAF-Lich 13951	Spain: Guadalajara	A.Crespo et al.	I, II, IV	MO
<i>Parmelina tiliacea</i>	MAF-Lich 15350	Portugal: Trás-os-Montes	V.J.Rico	I, II, IV	MO
<i>Parmelina tiliacea</i>	MAF-Lich 16467	Spain: Madrid	J.Nuñez Zapata	I, II, IV	MO
<i>Parmelinella wallichiana</i>	MAF-Lich 17030	Kenya	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmelinopsis horrescens</i>	MAF-Lich 17031	Spain: Tenerife	A.Crespo & P.K.Divakar	I, II	MO, TEM
<i>Parmelinopsis minarum</i>	MAF-Lich 10404	China: Yunnan: Ligiang Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmelinopsis neodamaziana</i>	MAF-Lich 17032	Australia: New South Wales	J.A.Elix	I, II	MO, TEM
<i>Parmelinopsis pindarensis</i>	MAF-Lich 15391	India: Almera	D.D.Awasthi	I, II	MO
<i>Parmelinopsis subfaticens</i>	MAF-Lich 10677	Australia: New South Wales	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, III	MO, TEM
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	MAF-Lich 4259	Canada: British Columbia	L.G.Sancho et al.	I, II	MO, TEM
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	MAF-Lich 17033	Spain: Madrid	A.Crespo & P.K.Divakar	I, II	MO
<i>Parmotrema abessinicum</i>	MAF-Lich 16939	Kenya: Rift Valley	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmotrema andinum</i>	URM 78874	Brasil: Pernambuco		I, II	MO

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Parmotrema cetratum</i>	Lücking 15116A	Uruguay: Maldonado	Osorio 9424	I, II	MO, TEM
<i>Parmotrema cetratum</i>	Lücking 15116A	Uruguay: Maldonado	Osorio 9424	I, II	MO, TEM
<i>Parmotrema cetratum</i>	MAF-Lich 7649	Uruguay: Maldonado	Osorio 9424	I, II	MO
<i>Parmotrema chinense</i>	MAF-Lich 7498	Australia: Australian Capital Territory	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II	MO, TEM
<i>Parmotrema eunetum</i>	A.Crespo 19566r	Kenya	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmotrema flavescens</i>	s/n	Brasil: Pernambuco	s/n	I, II	MO
<i>Parmotrema hababianum</i>	A.Crespo 19566k	Kenya	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmotrema latissimum</i>	Perez Ortega 56j	USA	S.Perez Ortega	I, II	MO
<i>Parmotrema nilgherrense</i>	ABL: Aptroot 55665	Kenya	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmotrema nilgherrense</i>	MAF-Lich 14292	Congo: Kahuzi-Biega National Park	B.Mamush	I, II, III	MO, TEM
<i>Parmotrema perforatum</i>	MAF-Lich 7651	USA: North Carolina: Hoke Co.	T.Bowers	I, II	MO, TEM
<i>Parmotrema perlatum</i>	MAF-Lich 6965	Portugal: Trás-os-Montes	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Parmotrema pilosum</i>	MAF-Lich 7656	Uruguay: Maldonado	F.Sacarabino	I, II	MO, TEM
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	MAF-Lich 16945	Brasil: Pernambuco	s/n	I, II	MO
<i>Parmotrema reticulatum</i>	MAF-Lich 10506	Australia: Cook Islands	J.A.Elix	I, II	MO
<i>Parmotrema thompsonii</i>	MAF-Lich 17034	India: Uttaranchal	P.K.Divakar	I, II	MO, TEM
<i>Parmotrema zollingeri</i>	s/n	Brasil: Pernambuco	s/n	I, II	MO
<i>Platismatia glauca</i>	F.Fernandez s/n	Spain: Madrid	F.Fernandez	I, II	MO, TEM
<i>Platismatia stenophylla</i>	MAF-Lich 6707	USA: Washington: Skamania Co.	T.H.Nash	I, II	MO
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	MAF-Lich 14279	Spain: Guadalajara	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	MAF-Lich 16860	Spain: Teruel	V.J.Rico	I, II	MO
<i>Protoparmelia badia</i>	MAF-Lich 6899	Australia: Australian Capital Territory	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II	MO
<i>Protoparmelia badia</i>	MAF-Lich 9893	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II	MO, TEM
<i>Protoparmelia nitens</i>	MAF-Lich 11435	Spain: Zamora	A.Crespo	I, II	MO
<i>Protoparmelia rhombosporea</i>	MAF-Lich 10524	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 5121	Austria: Styria	W.Obermayer	I, II, VI	MO

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 14129	Spain: Madrid	M.B. Gros Otero	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 14178	Spain: Madrid	E. Gonzáles Burgos	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15594	Morocco: Ifrane	A.Crespo et al.	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15595	Morocco: Ifrane	A.Crespo et al.	I, II, VI	AM, MO, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15596	Morocco: Ifrane	A.Crespo et al.	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15599	Spain: Castellón	A.Crespo et al.	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15600	Slovakia: Roznava	Z.Ferencova	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15601	Slovakia: Liptovsky Mikulas	Z.Ferencova	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15602	Slovakia: Poprad	Z.Ferencova	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15603	Slovakia: Spisska Nova Ves	Z.Ferencova	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15604	Turkey: Eskisehir	A.Crespo et al.	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 15605	Turkey: Eskisehir	A.Crespo et al.	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	MAF-Lich 17035	Spain: Segovia	A.Crespo et al.	I, II, VI	AM, MO, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	TFC 5875	Spain: Canary Island: La Palma	I. Perez-Vargas	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	TFC 7027	Spain: Canary Island: La Palma	I. Perez-Vargas	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia intensa</i>	S.Pérez-Ortega s/n	USA: Arizona: Chiricahua Mts.	S. Pérez Ortega	VI	AM, TLC
<i>Pseudevernia intensa</i>	MAF-Lich 6708	USA: Arizona: Gila Co.	T.H.Nash	I, II, VI	MO
<i>Pseudevernia aff. intensa</i>	MAF-Lich 15625	Mexico: State of Mexico	L.G.Sancho et al.	I, II, VI	MO
<i>Pseudevernia aff. intensa</i>	MAF-Lich 15627	Mexico: State of Mexico	L.G.Sancho et al.	I, II, VI	MO
<i>Punctelia flaventior</i>	MAF-Lich 5344	USA: Hawaii: Hawaii Co.	W.A.Weber et al.	I, II, III	MO
<i>Punctelia hypoleucites</i>	MAF-Lich 6553	USA: Arizona: Pima Co.	T.H.Nash	I, II	MO
<i>Punctelia subflava</i>	MAF-Lich 7623	Australia: Western Australia	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, III	MO
<i>Punctelia subflava</i>	MAF-Lich 7322	Australia: New South Wales	J.A.Elix	I, II	MO, TEM
<i>Punctelia subrudecta</i>	MAF-Lich 5727	Italy: Calabria	D.Puntillo	I, II	MO
<i>Ramalina capitata</i>	MAF-Lich 15229	Portugal: Trás-os-Montes	V.J.Rico	I	MO
<i>Relicina limbata</i>	MAF-Lich 10504	Australia: New South Wales	J.A.Elix	I, II, V	MO

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Relicinopsis intertexta</i>	MAF-Lich 15372	Thailandia: Nakhon Nayok	W.Polyiam	I, II, V	MO
<i>Relicinopsis rahegensis</i>	MAF-Lich 15373	Thailandia: Nakhon Nayok	W.Polyiam	I, II, V	MO
<i>Remototrachyna adducta</i>	MAF-Lich 10378	China: Yunnan: Yunlong Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO, TEM
<i>Remototrachyna adducta</i>	MAF-Lich 10206	China: Yunnan: Yunlong Co.	A.Crespo et al.	I, II, III	MO, TEM
<i>Remototrachyna flexilis</i>	MAF-Lich 13974	India: North Sikkim	P.K.Divakar	I, II	MO, TEM
<i>Remototrachyna incognita</i>	MAF-Lich 10385	China: Yunnan: Dali Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Remototrachyna kingii</i>	MAF-Lich 15610	India: Tamil Nadu	P.K.Divakar et al.	I, II	MO
<i>Remototrachyna scytophylla</i>	MAF-Lich 10410	China: Yunnan: Jian Chuan Co.	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Rhizoplaca bullata</i>	MAF-Lich 11561	Spain: Caceres	A.Crespo et al.	I	MO
<i>Rhizoplaca chrysoleuca</i>	MAF-Lich 16777	Spain: Teruel	V.J.Rico	I	MO
<i>Usnea florida</i>	MAF-Lich 15238	Portugal: Trás-os-Montes	V.J.Rico	I, II	MO
<i>Karoowia adhaerens</i>	BM 000676682	South Africa: Pretoria	Brusse	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia adligans</i>	BM 000763101	South Africa: Pretoria	Brusse	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia angustiphylla</i>	MAF-Lich 6768	USA: Illinois: Jackson Co.	T.H.Nash	I, II, III	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia azaniensis</i>	MAF-Lich 14269	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia conspersa</i>	MAF-Lich 6793	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II, III	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia conspersa</i>	MAF-Lich 10539	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Xanthoparmelia delisei</i>	MAF-Lich 7659	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II	MO
<i>Xanthoparmelia exornata</i>	MAF-Lich 14290	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia glabrans</i>	MAF-Lich 9912	Spain: Zaragoza	O.Blanco	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia hottentotta</i>	MAF-Lich 14291	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia insipida</i>	BM 000763089	South Africa: Pretoria	Brusse	I, II	MO
<i>Xanthoparmelia lineola</i>	MAF-Lich 9955	USA: Arizona	E.Barreno et al.	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia lithophila</i>	MAF-Lich 6900	Australia: New South Wales	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, III	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia lithophila</i>	MAF-Lich 9651	Australia: New South Wales	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia ovealmbornii</i>	MAF-Lich 14268	South Africa: Western Cape	A.Crespo et al.	I, II, III	MO

Tabla 1. Material utilizado (continuación).

Especie	Voucher	Localidad	Recolector(es)	Capítulo	Análisis
<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	MAF-Lich 6216	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia pulla</i>	MAF-Lich 7081	Spain: Salamanca	A.Crespo et al.	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia pulla</i>	MAF-Lich 7659	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia pulla</i>	MAF-Lich 12517	Spain: La Rioja	A.Crespo et al.	I, II	MO
<i>Xanthoparmelia pulloides</i>	MAF-Lich 6784	Spain: Zamora	A.Crespo & O.Blanco	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia subincerta</i>	MAF-Lich 7494	Australia: Australian Capital Territory	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, III	MO, TEM
<i>Xanthoparmelia sublaevis</i>	MAF-Lich 7460	Spain: Tenerife	A.Crespo et al.	I, II, III	MO
<i>Xanthoparmelia subspodochroa</i>	MAF-Lich 7463	Australia: New South Wales	M.C.Molina & J.A.Elix	I, II, III	MO
<i>Xanthoria parietina</i>	MAF-Lich 11377	Spain: Guadalajara	A.Crespo et al.	I, II	MO

MÉTODOS

Microscopia óptica (MO) - Capítulos I - VI

De cada muestra se separaron del talo tres apotecios maduros. En el caso de material fértil escaso, muestras delicadas o muestras de especie tipo, se utilizó sólo un apotecio por talo. Cada apotecio fue cortado a mano alzada con cuchilla de afeitar, utilizando la lupa binocular (Leica, Wild M8) a 40 aumentos. Los cortes se montaron en agua sobre un portaobjetos, se tiñeron con colorante Azul de lactofenol (Panreac, Barcelona) y se dejaron secar a temperatura ambiente sin calentar. Se hicieron preparaciones permanentes, montadas y selladas para su futura conservación y observación. De cada muestra se eligió una preparación destinada para aplastar, para poder observar y medir las esporas libres, fuera del asco.

También se hicieron cortes semifinos (0.5 μm) de los apotecios de las especies elegidas, detalladas en la Tabla 1. Se eligieron dos apotecios maduros de cada espécimen. Los apotecios se hidrataron con agua destilada durante 24 horas. Después se utilizó 2.5 % glutaraldehído en 0.1 M tampón fosfato para su fijación durante 6 horas. Las muestras se lavaron con el mismo tampón dos veces y se les aplicó 1 % tetróxido de osmio durante 2 horas como agente postfijación. Las muestras se deshidrataron en la serie gradual de acetona, tres veces durante 15 minutos en cada grado de acetona, siguiendo este orden de concentraciones: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, y 100%. Finalmente, los apotecios se incluyeron en resina Spurr (Spurr Resin Embedding Kit, TAAB S024, Fedelco, Madrid). De los bloques de resina se sacaron cortes semifinos, cortando en ultramicrotomo Ultracut-E Reichert-Jung (Leica, Ontario). Los cortes montados en un portaobjetos se tiñeron con el colorante Azul de toluidina (Panreac, Barcelona).

Para estudiar distintos estados del desarrollo del apotecio se cortaron talos y apotecios inmaduros de algunas especies seleccionadas.

Los cortes se observaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Badhoevedrop, Países Bajos), utilizando el método de campo claro y el efecto Nomarski, utilizando de manera sistemática distintos niveles de aumento para la comparación entre distintas especies y se hicieron las fotos a aumento 1000.

Se midieron entre treinta y cincuenta esporas maduras fuera del asco y entre veinte y treinta ascos maduros por espécimen (en distintos cortes y distintos apotecios). Cuando se utilizaron varios ejemplares de la misma especie, se hicieron los cálculos estadísticos conjuntos por especie.

Microscopia confocal de fluorescencia - Capítulo I

Se efectuaron cortes con cuchilla de afeitar a mano alzada, de aproximadamente 60 – 80 μm de grosor de apotecios inmaduros de *Parmelina quercina*. El proceso de fijación se llevó al cabo en vidrios de reloj con 2% paraformaldehído en tampón salino de fosfato, a

temperatura ambiente durante 90 minutos. Las muestras se lavaron tres veces durante 10 minutos con el tampón para eliminar el exceso de medio de fijación. Para permeabilizar las membranas celulares se aplicó a las muestras 5 ml de la solución 0.5 M NaOH y 1.5 M NaCl durante 10 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo tres veces durante 10 minutos con el tampón. Los cortes se tiñeron con 10 µl de colorante nuclear SYTOX Green 100 µM (S-7020, Molecular Probes, Eugene, OR) durante 7 minutos y se lavaron con agua destilada durante 2 minutos para eliminar el colorante excesivo. Los cortes se colocaron en portaobjetos y se observaron al microscopio confocal de fluorescencia (Leica TCS SP2).

Las descripciones se basan en cortes medianos perpendiculares al disco, directamente por el centro del apotecio.

Microscopia electrónica de transmisión (TEM) -Capítulo II

De los apotecios cortados para la microscopia óptica y en los que se confirmó la presencia de esporas, se tomaron las mitades sobrantes o unos cortes gruesos. Los trozos de apotecios se hidrataron con agua destilada durante 24 horas para conseguir su estado natural. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído (Tousimis, MD, USA) al 2,5 % en tampón fosfato sódico (Na_3PO_4 al 0,1 M, pH = 7,1) durante 6 horas a 4°C. Después se lavaron con el mismo tampón cinco veces y se les aplicó tetróxido de osmio (TAAB Laboratories, Reino Unido) al 1 % durante 2 horas como agente postfijación. Para eliminar el osmio se hicieron 3 lavados con agua destilada. Las muestras se deshidrataron en la serie gradual de acetona (Panreac, España), tres veces durante 15 minutos en cada grado de acetona, siguiendo este orden de concentraciones: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, y seis veces durante 15 minutos en acetona de 100%. Finalmente, los trozos de apotecios se incluyeron en resina Spurr (TAAB Laboratories, Reino Unido) empezando por incluirlos en una mezcla de resina: acetona pura durante 8 - 12 horas en oscuridad en los siguientes gradientes, 1:3; 1:1 y 3:1. Como último paso se incluyeron ya en la resina pura. De los bloques de resina se cortaron cortes semifinos (500 nm) con cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo Ultracut-E Reichert-Jung (Leica Microsystems, Ontario, Canada) que fueron teñidos con azul de toluidina (Panreac, España) y se observaron al microscopio óptico para confirmar la zona de interés (con esporas maduras). Posteriormente se sacaron cortes ultrafinos (50-70 nm) cortando con cuchilla de diamante en el mismo ultramicrotomo y se colocaron en unas rejillas de cobre donde se contrastaron con acetato de uranilo acuoso al 3% durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0,3 % durante 10 minutos para la observación con el microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (JEOL Korea Ltd., Corea del Sur) a 80 kV. De manera sistemática se observaron y fotografiaron a distintos niveles de aumento para la comparación entre distintas especies. Se evaluaron distintos estados del desarrollo esporal para el estudio ontogénico. De las esporas maduras (consideradas como tales por el estado de desarrollo de la pared, ya dividida en capas) y cortadas transversalmente se hicieron medidas aproximadas de las distintas capas.

Análisis estadísticos - Capítulo II

Para los análisis estadísticos y la representación gráfica de los resultados se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. Se utilizaron tres tipos de análisis: análisis de regresión simple, análisis de subgrupo y tabulación cruzada.

Estudios químicos - Capítulo VI

Se realizó el test de reacción (K = hidróxido potásico, C = hipoclorito sódico, KC = aplicación sucesiva de K y C, Pd = parafenil en diamina) y la cromatografía sobre capa fina (TLC) en dos distintas fases móviles (C y G).

Estudios moleculares y filogenéticos - Capítulo IV y VI

Los análisis filogenéticos se basaron en las secuencias del ADN de dos regiones elegidas, nuITS (espaciador transcrito interno del ADN ribosómico nuclear), mt SSU (subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial) en el Capítulo VI y de tres, nuITS, mt SSU, nu LSU (subunidad grande del ADN ribosómico nuclear) en el Capítulo IV.

La extracción del ADN genómico total se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Plant Mini (Qiagen), llevando a cabo algunas pequeñas modificaciones en el proceso según Blanco (2004). Con la reacción en cadena de la polimerasa *in vitro* (PCR) se amplificaron regiones del genoma seleccionados, nuITS, mt SSU y nuLSU (Capítulo IV), y nuITS, mt SSU (Capítulo VI). Se utilizaron estos juegos de los primers: ITS1F & ITS4 para nuITS, , mrSSU1 & mrSSU3R para mtSSU y LR0R y LR5 (Gardes & Bruns 1993, Rehner & Samuels 1994, Vilgalys & Hester 1990, White *et al.* 1990, Zoller *et al.* 1999). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl que estaba formado por 10 µl de ADN, 27,75 µl de H₂O destilada, 5 µl de tampón 10X (Biotools) (que incluye MgCl₂ 2 mM, KC 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM), 1µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 2,5 µl de cada uno de los primers (10 µM) y 1,25 µl de ADN polimerasa (1U/µL). En algunos casos se utilizaron PureTaq Ready-To-Go PCR beads añadidas al tubo con 5 µl de ADN, 17,5 µl de H₂O destilada, 1,25 µl de cada uno de los primers (10 µM). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático Techne Progene TC-3000 o PTC-100 Peltier, empleando las siguientes condiciones: la desnaturalización principal de 4-5min en 94°C, seguida por 35 ciclos de 1min en 94°C, 1min en 54°C (para nuITS y mtSSU), 56°C (para nuLSU), 1.5min en 72°C, acabando con la extensión final de 7-10min en 72°C.

Los fragmentos amplificados mediante PCR se purificaron utilizando el kit Bioclean Columns (Biotools) siguiendo el protocolo recomendado por la casa. El proceso consiste básicamente en eliminar los restos de los productos de reacción de la PCR mediante una serie de lavados y centrifugaciones a través de una columna con un tamaño de poro fijado. La

cuantificación de los productos resultantes se determinó mediante electroforesis a 100-110 V utilizando geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (Sambrook *et al.* 1989). Para poder visualizar los fragmentos de ADN obtenidos se adicionó bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Upland CA 91786 USA) estimando su concentración y tamaño por comparación con un patrón de peso molecular (Bio-Rad 50-2000 pb). Los productos purificados, con una concentración entre 10-30 ng/µl, se secuenciaron en el Centro de Genómica (Parque Científico, UCM). La secuenciación se realizó utilizando el kit de reacción Big Dye→ Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas en dirección 5'-3' y 3'-5' de cada uno de los productos de PCR fueron comparadas y alineadas manualmente utilizando el programa SeqMan 4.03 (DNASStar). Posteriormente, se generaron matrices correspondientes a las secuencias de cada una de las tres regiones amplificadas. Las secuencias de las matrices de cada una de las tres regiones amplificadas fueron alineadas independientemente de forma manual utilizando el editor de secuencias BIOEDIT 5.0.6 (Hall 1999).

Se realizaron los análisis filogenéticos de Neighbor Joining (NJ) y Maximum Likelihood (ML) mediante el programa PAUP4.0* (Swofford 2003). El método de NJ busca el árbol que representa la suma más pequeña de la longitud de las ramas (distancia). Esta distancia se expresa como la fracción de sitios que difieren entre dos secuencias en un alineamiento múltiple. Por otra parte, los métodos de Maximum Likelihood (ML) calculan el árbol que maximiza la probabilidad de los datos (secuencias), asumiendo un modelo de evolución nucleotídica. El soporte de las relaciones fue estimado por el bootstrap de 2000 replicacas. Los valores de bootstrap iguales o por encima de 90 eran considerados como significativos. Los árboles filogenéticos se dibujaron utilizando el programa TREVIEW (Page 1996).

Capítulo I

Estructura del apotecio en la familia *Parmeliaceae*, con especial referencia al excípulo propio. Anatomía, ontogenia y significado filogenético.

Los resultados de este capítulo han sido presentados en el 7º Simposio de la Asociación Internacional de Lichenología (IAL) bajo el título: "The apothecium in *Parmeliaceae*: A novelty within Lecanoromycetes". Actualmente se encuentra en proceso de preparación para el envío a la revista internacional *MycKeys*.

RESUMEN

La presencia de un excípulo propio cupulado en los apotecios de *Parmeliaceae*, que había sido sugerido como una característica única dentro Lecanoromycetes, se confirma aquí mediante el estudio comparativo de más de 150 especies. Por otra parte, la ontogenia del apotecio revela otra característica peculiar: el ascogonio aparece por encima de la capa algal, en lugar de por debajo de ella y dentro de la médula como ocurre en otros Lecanoromycetes. Los apotecios de todos los parmeliáceos comparten una organización común con el himenio y el subhimenio bordeados por un excípulo propio, a su vez rodeado por una capa continua de algas. Se diferencian cinco tipos de excípulo propio sobre la base de la anatomía fina y la anchura de tres capas: la capa hialina, la capa intermedia y la capa basal de apariencia cortical. El tipo de excípulo es uniforme para cada especie pero puede variar dentro de algunos géneros. Los clados principales de no se correlacionan con un tipo del excípulo, sino que se demuestra la variabilidad en cada clado. La anatomía del apotecio no muestra un patrón filogenético claro, aunque en algunos casos ha proporcionado caracteres de apoyo para la delimitación de nuevos géneros (por ejemplo *Austroparmelina*, *Remototrachyna*, *Notoparmelia*) de *Parmeliaceae*.

ABSTRACT

The presence of a cupulate proper exciple in the apothecia of *Parmeliaceae*, suggested as a unique feature within Lecanoromycetes, is confirmed here based on a comparative study of more than 150 species. Moreover, the apothecium ontogeny shows another peculiar feature: the ascogonium appears above the algal layer instead of below it, inside the medulla as occurs in other Lecanoromycetes. The apothecia of all *Parmeliaceae* share a common form with hymenium, subhymenium and hyaline layer bordered by a two-layered cortex-like proper exciple, which is girdled by a continuous algal layer. Five types of proper exciple are distinguished based on the finescale anatomy and width of the layers. The type of exciple is uniform for each species but it can vary within some genera. The apothecium anatomy does not show a clear phylogenetic pattern and the major clades do not correlate with a single type of apothecium. Despite this, in some cases it has provided supporting characters for delimitation of new genera (e.g. *Austroparmelina*, *Notoparmelia*, *Remototrachyna*) of *Parmeliaceae*.

INTRODUCCIÓN

Familia Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycota)

Parmeliaceae es una de las mayores y mejor conocidas familias de líquenes, englobando más de 2000 especies organizadas en 86 géneros (Lumbsch & Huhndorf 2010). Según el estudio molecular constituye un grupo monofilético bien respaldado (Crespo *et al.* 2007) que se caracteriza fenotípicamente por caracteres ontogenéticos, morfológicos y anatómicos del cuerpo fructífero como son: 1) ontogenia supramedular / supraalgal (origen ontogenético en la zona inferior del cortex de talo, por encima de la capa algal), 2) desarrollo ascohiménial gimnocárpico o hemiangiocárpico (los ascos están organizados en el himenio expuesto o inicialmente cubierto y luego expuesto) y 3) presencia de una estructura característica en el apotecio, el excípulo propio cupulado (Henssen & Jahns 1974).

Los representantes de esta familia son en su mayoría macrolíquenes y presentan distintas formas de crecimiento. La mayoría de las especies son líquenes foliáceos (p.ej. *Parmelia*), fruticulosos (p.ej. *Pseudevernia*) y subfruticulosos (p.ej. *Cetraria*), pero también podemos encontrar crustáceos (p.ej. *Protoparmelia*) y umbilicados, peltados, subcrustáceos (p.ej. *Xanthoparmelia*). Además dentro de *Parmeliaceae* se incluye un género de hongos liquenícolas, *Nesolechia* (sin. *Phacopsis*).

La sistemática y taxonomía

La taxonomía de los líquenes parmeliáceos se apoya principalmente en los caracteres vegetativos, p.ej. tipo de córtex superior, tipo de polisacárido presente en las paredes celulares, estructuras superficiales de intercambio gaseoso, presencia y tipo de cilios y rizinas, tipo de extrolitos (Crespo *et al.* 2011). Los caracteres generativos, habituales en la taxonomía de otros hongos, en los líquenes se han utilizado comúnmente en el caso de los grupos crustáceos y otros microlíquenes. Sin embargo en los grupos foliáceos se han utilizado con menos frecuencia porque son bastante uniformes (Hale 1984, Hafellner 1994). En los parmeliáceos han sido aún más infrautilizados debido también a la alta frecuencia de talos estériles, especialmente en el caso de los parmelioides, donde un gran porcentaje de las especies descritas solo se conocen estériles o, al menos, el tipo es estéril (Crespo *et al.* 2011).

Algunos autores han hecho hincapié en la importancia del apotecio para el estudio de distintos grupos de líquenes parmeliáceos. Así, Kärnefelt *et al.* (1992) relacionaron el tipo de asco con la sistemática de los líquenes cetrarioides. Thell *et al.* (1995) estudiaron y distinguieron ocho formas distintas de asco en líquenes parmelioides y alectoriodes. En la

clave sinóptica de la familia *Parmeliaceae* (Elix 1993) el tamaño y la forma de las esporas fueron considerados como caracteres con mucho valor a nivel de género. Del Prado *et al.* (2007) describieron un único tipo de ascósporas para *Xanthoparmelia*. Además el interés del estudio anatómico de las estructuras excipulares fue propuesto por Hawksworth (1988) para el género *Xanthoparmelia*. Nash *et al.* (1990) incluyeron la zona excipular como carácter complementario en el estudio de los líquenes umbilicados de esta familia. Sincock (1982) en un trabajo inédito aplicó la microscopia electrónica de barrido como herramienta de análisis del valor taxonómico de la estructura interna del apotecio en 19 especies de la familia *Parmeliaceae*. Kärnefelt *et al.* (1998) revisan la presencia de excípulo propio entre otros caracteres morfológicos y anatómicos de los géneros usneoides confirmando sus posición en *Parmeliaceae*.

Por otra parte, la utilización del desarrollo del cuerpo fructífero como carácter fundamental para la clasificación en el trabajo de Henssen & Jahns (1974) ha sido uno de los mayores avances en la taxonomía y clasificación de los líquenes. Los caracteres ontogenéticos tienen mucha importancia en la taxonomía de ascomicetes liquenizados y no liquenizados a nivel de orden y familias (Kauff & Büdel 2005, Lumbsch *et al.* 2001, Schultz *et al.* 2001). Jahns *et al.* (1995) discuten los problemas pendientes en la ontogenia de órganos reproductivos de líquenes en relación con taxonomía, concluyendo que las controversias se refieren más a las interpretaciones que a las observaciones.

Filogenia

A lo largo de la última década se ha llevado a cabo la reevaluación taxonómica de los géneros parmeliáceos utilizando como base las hipótesis filogenéticas inferidas a partir de los análisis moleculares (Blanco *et al.* 2004, 2005, Divakar *et al.* 2006, Wirtz *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2007, 2010b). Numerosos estudios han revelado que algunas especies morfológicas con amplia distribución incluyen distintos linajes (Molina *et al.* 2004, Divakar *et al.* 2005, 2010a, Argüello *et al.* 2007, Núñez-Zapata *et al.* 2011). Además, los trabajos filogenéticos demuestran que algunos géneros descritos sobre la base de unos pocos caracteres morfológicos y/o químicos son polifiléticos.

En otros casos los estudios moleculares han permitido revelar el significado taxonómico y filogenético de caracteres micromorfológicos no conocidos hasta entonces. Por ejemplo, los caracteres micromorfológicos de los apotecios han sido ignorados mucho tiempo en los líquenes parmelioides, basándose en el supuesto que son uniformes dentro del grupo (excepto el tamaño de esporas, Elix 1993). Un buen número de trabajos recientes (del Prado *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010a, Divakar *et al.* 2010b) indican que estos caracteres necesitan mas atención que la que se les ha prestado hasta el momento.

Los órganos de reproducción sexual

En Lecanorales, los órganos de reproducción sexual son apotecios que se encuentran en la superficie del talo. El apotecio maduro tiene forma de copa o plato y esta compuesto por himenio, subhimenio y estructuras excipulares.

1. El himenio esta expuesto en un plano casi circular. Contiene los ascos (en general con 8 ascósporas) y los filamentos interascales, llamados paráfisis. La parte superior del himenio suele estar pigmentada y se diferencia como epihimenio.

2. El subhimenio se encuentra debajo del himenio, es asco- y parafisogénico (lleva las hifas, que dan origen a ascos y paráfisis) y se caracteriza fácilmente por la presencia de las ramas terminales de las hifas ascógenas o sus restos.

3. El excípulo es estéril y puede tener forma anular (alrededor del himenio) o cupular (alrededor y por debajo del himenio y subhimenio). En los ascomicetes liquenizados diferenciamos dos tipos de apotecios: a) lecanorino, con doble excípulo compuesto por el excípulo talino que es externo y contiene algas, y el excípulo propio que es interior y puramente fúngico; b) lecideino, exclusivamente compuesto por excípulo propio.

El apotecio de los parmeliáceos es lecanorino pero con características peculiares, ya que presenta un excípulo propio particular, encontrado únicamente en los representantes de esta familia (Fig. 1).

El desarrollo del apotecio

El desarrollo del apotecio ha sido estudiado principalmente por dos grandes escuelas. La “escuela francesa” propuso muchos términos nuevos tanto para las distintas etapas del desarrollo como para los distintos tejidos (Bellemère & Letrouit-Galinou 1988). La “escuela alemana” ha sido más conservadora en la terminología (Henssen & Jahns 1974). En general coinciden en que se pueden distinguir cuatro fases generales en el desarrollo de apotecio (Letrouit-Galinou & Bellemère 1989, Letrouit-Galinou *et al.* 1994):

1) formación del “primordio” dentro del talo, como un conjunto esférico de hifas vegetativas no diferenciadas rodeando el ascogonio

2) formación del “ébauche” (cuerpo primario) por el crecimiento del primordio y su diferenciación en nuevas estructuras estériles que rodean los elementos fértiles (hifas ascógenas)

3) formación del aparato paratecial, el conjunto de las hifas bifurcadas que se ramifican intensamente en sus partes terminales y alargan en la base provocando así al

crecimiento del diámetro de apotecio. El aparato paratecial formará el excípulo propio del apotecio.

4) fase de apotecio maduro, con todos los componentes estériles desarrollados

Según Jahns *et al.* (1995), la ontogenia del ascocarpo ha mostrado ser una herramienta útil para la delimitación de las familias de los líquenes porque incluye mucha variedad de caracteres adquiridos por el desarrollo natural del cuerpo fructífero y se correlaciona con las tendencias en la diferenciación del talo.

En la familia *Parmeliaceae* el desarrollo del apotecio ha sido estudiado en detalle en estas especies: *Parmelia conspersa* (=sin. *Xanthoparmelia conspersa*) (Letrouit-Galinou 1970), *Parmelia exasperata* (=sin. *Melanohalea exasperata*) (Henssen & Jahns 1974), *Letharia columbiana* y *Protousnea magellanica* (Hähndel 1977, Henssen 1981), *Omphalodiella patagonica* (=sin. *Xanthoparmelia peltata*) (Henssen 1991), *Omphalodium pisacomense* y *Omphalora arizonica* (Henssen 1992a), *Placoparmelia patagonica* (=sin. *Xanthoparmelia patagonica*) (Henssen 1992b), *Neofuscelia almbornii* (=sin. *Xanthoparmelia almbornii*) y *Neofuscelia squamariata* (=sin. *Xanthoparmelia squamariata*) (Henssen & Titze 1992), *Protoparmelia badia* (Henssen 1995), *Arctoparmelia centrifuga* (Jahns *et al.* 1995) y *Himantormia lugubris* (Sojo *et al.* 2003). En todos los casos el desarrollo sigue el mismo patrón, típico para la familia aunque con distinto grado de hemiangiocarpia (el himenio está cerrado en las primeras fases del desarrollo y su exposición a la superficie ocurre después del desarrollo de las primeras paráfisis pero antes de la maduración de los ascos) hasta gimnocarpia (el himenio está expuesto desde principio del desarrollo).

Letrouit-Galinou & Bellemère (1989) en su estudio ontogenético de distintos géneros de líquenes definen el modo de desarrollo del apotecio en *Parmeliaceae* como un caso peculiar con el aparato paratecial presumiblemente atípico. La razón está en la dificultad de interpretar el desarrollo de algunas estructuras, entre ellas la estructura basal del excípulo propio de apariencia cortical, porque no corresponden a ninguna estructura generalmente encontrada en otros hongos liquenizados o no liquenizados.

La terminología

La terminología aplicada en la anatomía del apotecio en los líquenes es aún confusa. El único término constante es el que se refiere a la zona fértil, el himenio. Todos los demás, como subhimenio, hipotecio, paratecio, anfitecio, excípulo propio y excípulo talino han sido utilizados por varios autores para describir distintas regiones del apotecio. La confusión deriva principalmente de que el mismo término ha sido utilizado en distintas especies para

describir estructuras que no son homólogas. Unos autores los utilizaron puramente para la descripción de un apotecio maduro y otros los aplicaron en estudios ontogenéticos.

Especialmente, el término excípulo propio ha sido empleado de distintas formas. Se refiere a la capa puramente fúngica de hifas derivadas del ascocarpo que rodean al himenio y al subhimenio (Ryan *et al.* 2005). Por lo general se ha empleado para describir la envuelta completa. Sin embargo, en algunos casos ha sido utilizado para describir sólo la parte lateral.

Los términos subhimenio y hipotecio se utilizaron en algunos trabajos como sinónimos, incluso en algunos trabajos se intercambiaron sus significados.

En contraste con las plantas vasculares, que tienen los tejidos de desarrollo embrional compuestos de células típicas que suelen variar morfológicamente según la ontogenia y la fisiología, los talos de los hongos liquenizados están compuestos por hifas de origen indiferenciado y desarrollo mitótico apical y simple. En los hongos las estructuras organizadas como tejidos se forman ex-post durante el desarrollo, es decir, no proceden de células madre tempranamente determinadas. Estos tejidos en líquenes se diferencian según: 1) la orientación de las hifas y su dirección de crecimiento, 2) la ramificación de las hifas y las anastomosis que producen, 3) la proporción entre el grosor del lumen y la pared de las hifas, 4) la posición final del tejido en relación con otros tejidos, con la superficie del talo y con otros órganos. Sin embargo, como los tejidos fúngicos pueden alcanzar gran desarrollo y complejidad pueden asemejar a los tejidos ex-ante de origen embrional de las plantas vasculares. Por analogía se les aplicó incorrectamente una terminología basada en la que está aceptada para plantas, además de la que se desarrolló específicamente para los hongos o incluso especialmente para líquenes. La descripción de nuevos tipos generó numerosos términos en un aparente exceso de precisión. Incluso, varias veces se han malinterpretado los trabajos previos. Todo eso ha llevado a la confusión que aún esta presente en muchos textos y que no queda aclarada en los consensos recogidos en el diccionario de hongos, Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (Kirk *et al.* 2008).

En este trabajo utilizaremos sólo los términos himenio, subhimenio, excípulo propio, excípulo talino tal como se puede observar en la Fig. 1. Todos los términos con el sufijo “-tecio” se consideran obsoletos (Hawksworth pers. com.).

OBJETIVO

El estudio sistemático en detalle de los caracteres de los apotecios en *Parmeliaceae* es uno de los principales objetivos en esta tesis. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la estructura interna (anatomía) del excípulo propio de los líquenes parmelioides y la relación de dicho carácter micromorfológico con la filogenia de la familia *Parmeliaceae*. Se han estudiado representantes de 35 géneros de la familia, con especial énfasis en el principal clado monofilético de la familia, el clado parmeliode, que contiene aproximadamente 30 géneros. Se compararon los apotecios maduros de 161 especies distintas buscando el valor taxonómico de la estructura fina del excípulo propio.

MATERIAL

El material utilizado en este trabajo consiste en muestras de líquenes de herbarios, principalmente del Herbario MAF-Lich, del Departamento de Biología Vegetal II (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid). Se analizaron detalladamente 161 especies distintas de líquenes. 132 de ellas pertenecientes al clado parmeliode de la familia *Parmeliaceae*, 18 de otros clados de la misma familia y once de otros géneros de Lecanoromycetes. La información precisa de las muestras está en la Tabla 1 en apartado general de la memoria doctoral, "Material".

MÉTODOS

Microscopía óptica

De cada muestra se separaron del talo tres apotecios maduros. En el caso de material fértil escaso, muestras delicadas o muestras de especie tipo, se utilizó sólo un apotecio por talo. Cada apotecio fue cortado a mano alzada con cuchilla de afeitar, utilizando la lupa binocular (Leica, Wild M8) a 40 aumentos. Se realizaron cortes transversales, perpendiculares a la superficie del disco de apotecio, pasando por el centro y obteniendo así cinco cortes de cada apotecio. Los cortes se montaron en agua sobre un portaobjetos, se tiñeron con colorante Azul de lactofenol (Panreac, Barcelona) y se dejaron secar a temperatura ambiente sin calentar. Se hicieron preparaciones permanentes, montadas y selladas para su futura conservación y observación.

Para estudiar distintos estados del desarrollo del apotecio se cortaron talos y apotecios inmaduros de algunas especies seleccionadas (*Austroparmelina endoleuca*, *Flavoparmelia feraz*, *Flavoparmelia haysomii*, *Flavoparmelia secalonica*, *Hypotrachyna fissicarpa*,

Notoparmelia tenuirima, *Parmelina quercina*, *Parmotrema andinum*, *Remototrachyna flexilis*, *Xanthoparmelia conspersa*).

También se hicieron cortes semifinos (0.5 μm) de los apotecios de algunas especies. Se eligieron dos apotecios maduros de cada espécimen. Los apotecios se hidrataron con agua destilada durante 24 horas. Después se utilizó 2.5 % glutaraldehído en 0.1 M tampón fosfato para su fijación durante 6 horas. Las muestras se lavaron con el mismo tampón dos veces y se les aplicó 1 % tetróxido de osmio durante 2 horas como agente postfijación. Las muestras se deshidrataron en la serie gradual de acetona, tres veces durante 15 minutos en cada grado de acetona, siguiendo este orden de concentraciones: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, y 100%. Finalmente, los apotecios se incluyeron en resina Spurr (Spurr Resin Embedding Kit, TAAB S024, Fedelco, Madrid). De los bloques de resina se sacaron cortes semifinos, cortando en ultramicrotomo Ultracut-E Reichert-Jung (Leica, Ontario). Los cortes montados en un portaobjetos se tiñeron con el colorante Azul de toluidina (Panreac, Barcelona).

Los cortes obtenidos mediante las dos técnicas descritas se observaron con el microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Badhoevedrop, Países Bajos), utilizando el método de campo claro y el efecto Nomarski. Se hicieron las fotos en distintos niveles de aumento para la comparación entre distintas especies.

Microscopia confocal de fluorescencia

Se efectuaron cortes con cuchilla de afeitar a mano alzada, de aproximadamente 60 – 80 μm de grosor de apotecios inmaduros de *Parmelina quercina*. El proceso de fijación se llevo al cabo en vidrios de reloj con 2% paraformaldehído en tampón salino de fosfato, a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las muestras se lavaron tres veces durante 10 minutos con el tampón para eliminar el exceso de medio de fijación. Para permeabilizar las membranas celulares se aplicó a las muestras 5 ml de la solución 0.5 M NaOH y 1.5 M NaCl durante 10 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo tres veces durante 10 minutos con el tampón. Los cortes se tiñeron con 10 μl de colorante nuclear SYTOX Green 100 μM (S-7020, Molecular Probes, Eugene, OR) durante 7 minutos y se lavaron con agua destilada durante 2 minutos para eliminar el colorante excesivo. Los cortes se colocaron en portaobjetos y se observaron al microscopio confocal de fluorescencia (Leica TCS SP2).

Las descripciones se basan en cortes medianos perpendiculares al disco, directamente por el centro del apotecio.

RESULTADOS

Las especies de la familia *Parmeliaceae* tienen apotecios lecanorinos, es decir, presentan excípulo talino y excípulo propio (Fig.1). El excípulo propio es particular, compuesto por la capa hialina, capa intermedia y la estructura basal de apariencia cortical (*the husk* en inglés, Letrouit-Galinou & Bellemere 1989, p. 225; *la coque* en francés, Letrouit-Galinou 1970, p.41). Todos los demás taxones con apotecios lecanorinos (Fig. 2) no presentan el excípulo propio cupulado de tipo parmeliáceo.

Morfología del apotecio lecanorino con el excípulo propio parmeliáceo

En la Figura 1B se puede ver el esquema general de este apotecio: 1) Himenio compuesto por las paráfisis y por los ascos. 2) Subhimenio, debajo del himenio, formado por las hifas ascógenas (hifas basales que dan origen a los ascos) y paráfisis. 3) Capa hialina debajo del subhimenio. 4) La capa intermedia. 5) La estructura basal de apariencia cortical rodeando las estructuras anteriores por los lados y por debajo. 6) La capa algal que es continua por debajo del excípulo propio, entrando por los dos lados al excípulo talino y enlazando con la capa algal debajo del cortex. 7) Excípulo talino, a modo de pliegue, envolviendo todas las estructuras anteriores.

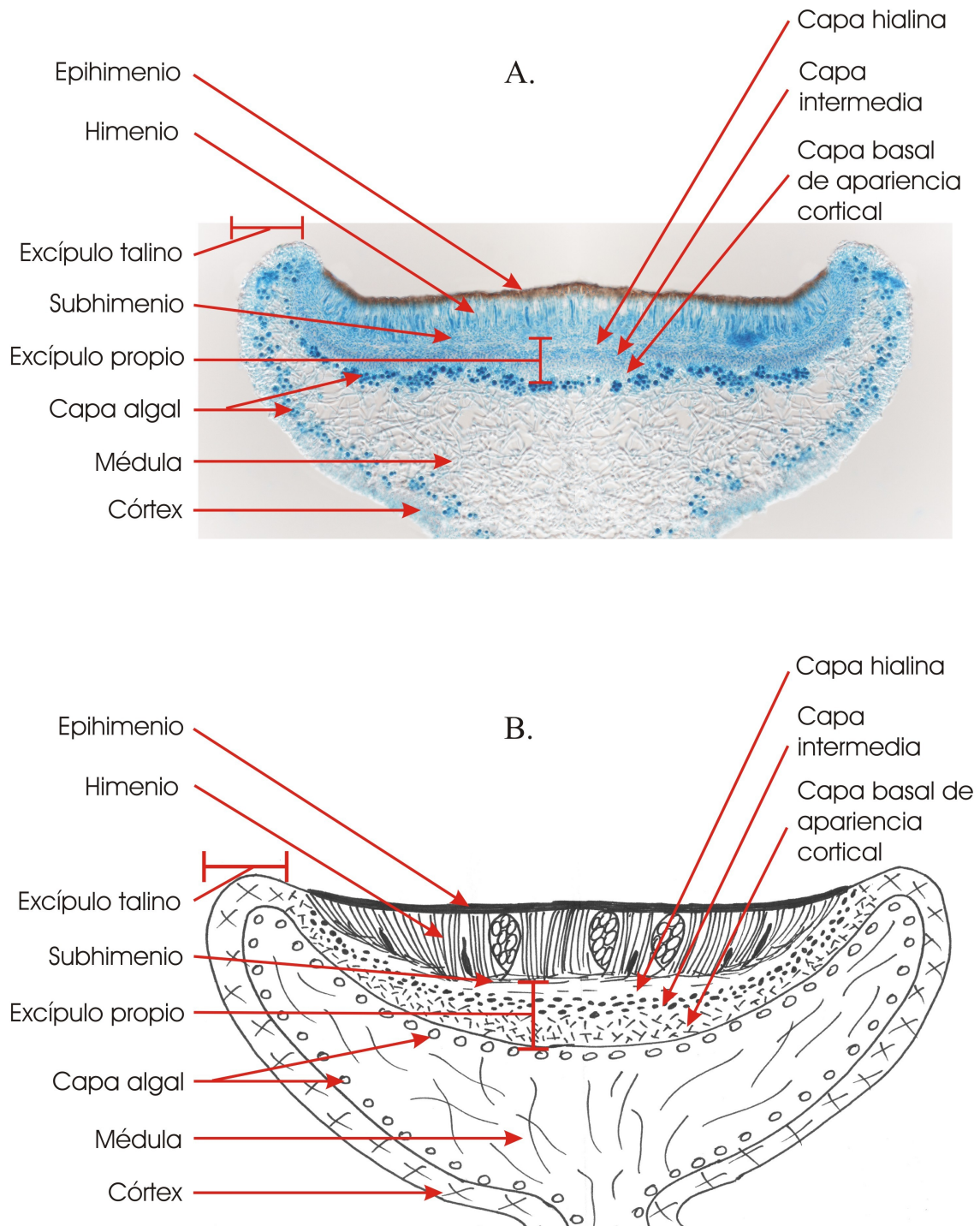


Figura 1 – *Austroparmelina endoleuca*. **A.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm . **B.** Esquema del apotecio lecanorino con el excípulo propio compuesto por tres capas: capa hialina, capa intermedia y estructura basal de apariencia cortical (apotecio parmeliáceo).

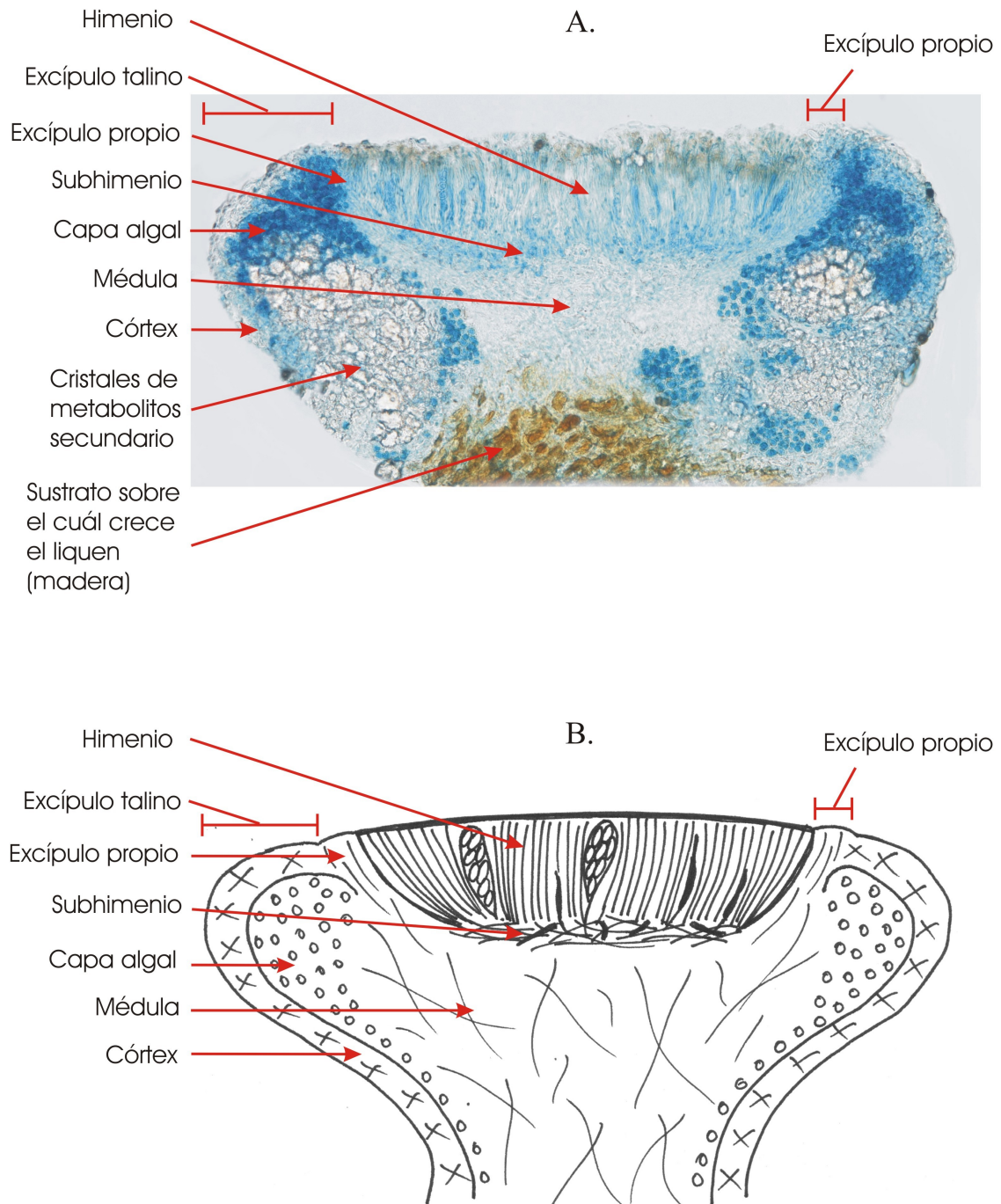


Figura 2 – *Lecanora muralis*. **A.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm . **B.** Esquema del apotecio lecanorino.

Desarrollo ontogenético del apotecio parmeliáceo (Figuras 3 y 4)

El apotecio en *Parmeliaceae* se origina en la parte basal del córtex superior, siempre por encima de la capa algal (Fig. 3A).

1. En la primera fase (Fig. 3A, C) se observan agrupamientos de ascogonios. Los ascogonios son hifas arqueadas irregularmente, fuertemente teñidas y con lumen mas ancho que las hifas de alrededor. Sus tricóginas se proyectan por encima del talo (T en Fig. 3B, Jahns & Ott 1995).

2. En la segunda fase (Fig. 3D) el primordio está creciendo y está rodeado en su parte inferior por la capa algal.

3. En la tercera fase (Fig. 3E) el primordio esta estructurado y se observa la formación de una estructura que rodea una zona central formada por las hifas embebidas en una matriz gelatinosa. En esta fase, las hifas ascógenas casi no se ven.

4. En la cuarta fase (Fig. 3F) aparecen las hifas ascógenas en la parte superior de la zona central (el futuro subhimenio). La estructura que la rodea se empieza a diferenciar en dos capas, la interna (en las descripciones de apotecio maduro nos referimos a ella como capa intermedia), que sigue mas activa, con el lumen de las hifas ancho y muy teñido, y la externa (en las descripciones del asco maduro nos referimos a ella como capa basal), con el lumen de las hifas más estrecho, y mas o menos embebida en una masa mucilaginosa (según la especie).

5. En la quinta fase (Fig. 4A) se observa el crecimiento de las primeras paráfisis. Las paráfisis pueden estar libres en sus partes terminales o todavía conectadas con la capa de cobertura (dependiendo del grado de hemiangiocarpia).

6. En la sexta fase (Fig. 4B), empieza a desaparecer la cubierta superior dejando las paráfisis del himenio expuestas al exterior. La capa de cobertura puede presentar distintos grados de desarrollo, en función de grado de hemiangiocarpia. Las partes del talo contiguas al primordio apotecial en desarrollo crecen y forman el excípulo talino alrededor del primordio. El excípulo propio ya está diferenciado en la capa hialina, capa intermedia y capa basal de apariencia cortical.

7. En la septima fase (Fig. 4C), se puede observar el himenio incurvado compuesto por las paráfisis embebidas en el mucílago himenial y el subhimenio compuesto por las hifas ascógenas extendidas horizontalmente y produciendo los ascos entre las paráfisis. El crecimiento más rápido del excípulo y de la zona central ha superado el del himenio lo que ha llevado a la incurvación del disco. El subhimenio está visible por la presencia de muchas hifas ascógenas que dan origen a los ascos. La capa hialina está aún muy ancha.

8. La última fase del desarrollo es la del apotecio adulto (Fig. 4D) con los ascos maduros entre las paráfisis. El excípulo propio ha adelgazado al progresar el crecimiento del himenio, y paralelamente el disco se ha hecho menos cóncavo. La capa algal está continua desde el talo, pasando por el pliegue que forma el borde talino y por debajo del excípulo propio del apotecio. El excípulo talino presenta el mismo tipo de córtex que el talo.

Anatomía microscópica del excípulo propio parmeliáceo (Fig. 5A)

El excípulo propio es la pared propia del apotecio y está formado por hifas fúngicas. Se diferencia en 1) la capa hialina, 2) la capa intermedia y 3) la capa basal de apariencia cortical.

1) La capa hialina se encuentra directamente debajo del subhimenio. Está formada por relativamente pocas hifas con orientación horizontal que conectan el subhimenio con la parte inferior del excípulo propio (Fig. 15D). Su aspecto hialino se debe a la abundante matriz extracelular presente. Hemos observado variabilidad tanto en el grosor de esta capa, como en la presencia de menos o más matriz extracelular.

2) La capa intermedia localizada justo debajo de la capa hialina, está compuesta por hifas con lumenes anchos que se tiñen intensamente con el azul de lactofenol. Su estructura varía muy poco entre distintas especies y la variabilidad se observa principalmente en el grosor de la capa y el número de células que la forman.

3) La capa basal de apariencia cortical adyacente a la capa algal tiene aspecto de color más claro que la anterior y está compuesta por hifas con lumen más estrecho. Es la capa que presenta más variabilidad tanto en la forma de las células, orientación de las hifas, distancia entre las hifas, como en el grosor de la misma. A esta estructura se refirieron autores con diferentes términos, como "la cáscara" (*la coque* en francés, *the husk* en inglés; Letrouit-Galinou 1970 p.41, Letrouit-Galinou & Bellemère 1989 p. 225), excípulo meristemático (Henssen 1981).

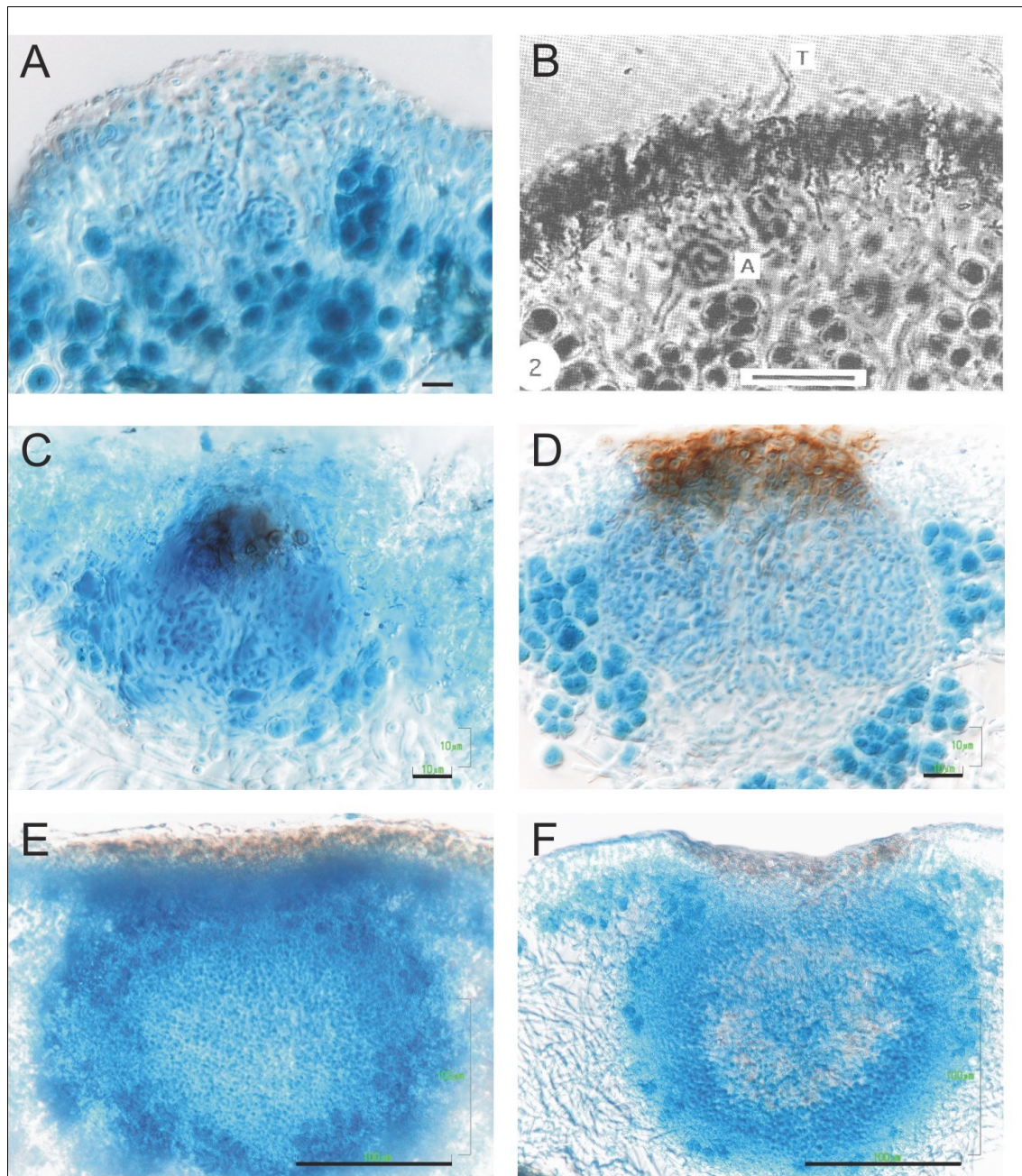


Figura 3 – Desarrollo ontogenético del apotecio parmeliáceo. **A.** *Flavoparmelia ferax*. Ascogonios (A) con forma de espiral, desarrollándose en la capa cortical, por encima de la capa algal. **B.** *Arctoparmelia centrifuga*. Ascogonios (A) con forma de espiral y su tricógina (T), foto tomada de Jahns *et al.* (1995). **C.** *Remototrachyna flexilis*. Primordio compuesto por el agrupamiento de varios ascogonios. **D.** *Hypotrachyna fissicarpa*. Primordio. **E.** *Parmelina quercina*. Primordio con el excípulo propio estructurado en dos capas, capa hialina (CH) central y zona de apariencia cortical alrededor. **F.** *Parmelina quercina*. Primordio con excípulo propio dividido en tres capas, capa hialina (CH), capa intermedia (CInt) más oscura y la capa basal (CBas) mas clara. En el centro del primordio se observan las hifas ascógenas (HA). Escala: A, C, D = 10µm; B = 25 µm; E, F = 100µm.

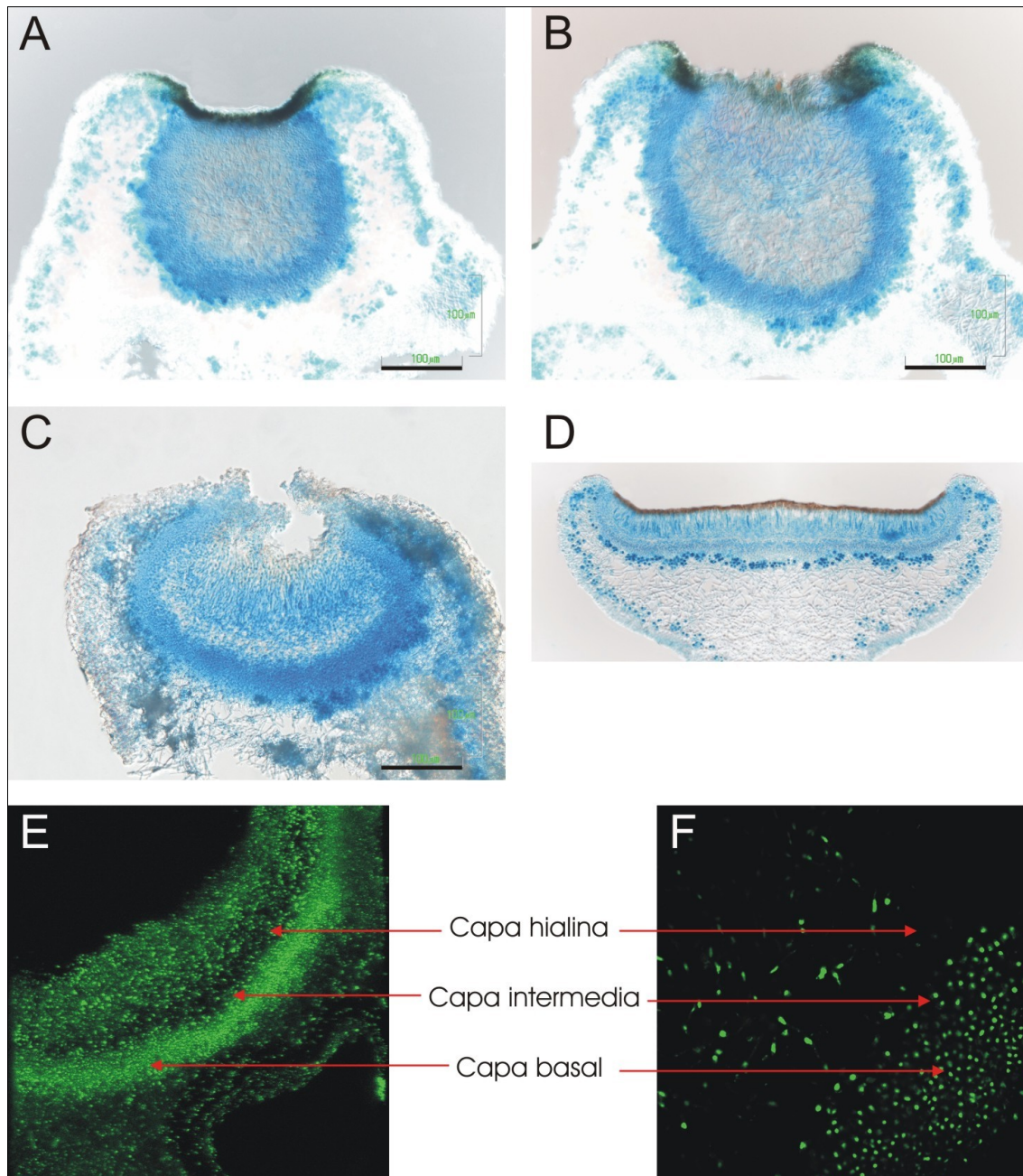
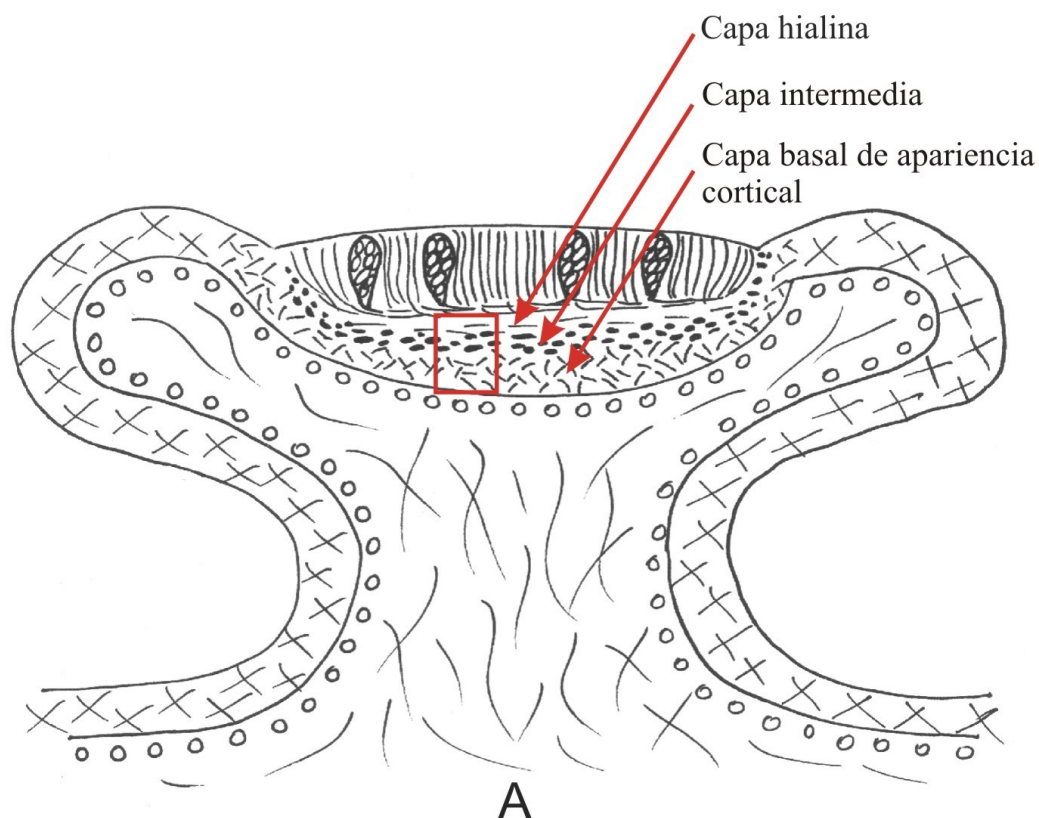


Figura 4 – **A. - D.** Continuación de la Figura 3, desarrollo ontogenético del apotecio parmeliáceo. **A.** *Parmotrema andinum*. Las paráfisis (P) están aún conectados con la capa de cubierta (CC). **B.** *Parmotrema andinum*. Las paráfisis (P) están libres y el himenio está expuesto al exterior. **C.** *Parmelina quercina*. El apotecio joven, con ascos inmaduros. Se observa la diferenciación del subhimenio y de la capa hialina (CH). **D.** *Austroparmelina endoleuca*. Apotecio maduro. **E. - F.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de corte del apotecio de *Parmelina quercina*. **E.** En la parte basal del excípulo propio, los núcleos están distribuidos homogéneamente, recordando así el tejido paraplectenquimático. **F.** El detalle de la figura anterior..



	tipo I	tipo II	tipo III	tipo IV	tipo V
Capa hialina (μm)	10 - 15 -(20)	(5)- 10 - 25 -(30)	(5)- 10 - 25 -(35)	(20)- 25 - 35 -(40)	30 - 40 ó 70 - 80
Capa intermedia (μm)	(5)- 10 - 15 -(20)	(5)- 10 - 15 -(25)	(5)- 10 - 20	(5)- 15 - 20	
Capa basal (μm)	(15)- 25 - 50 -(75)	(10)- 15 - 40 -(50)	(10)- 15 - 35 -(50)	10 - 20 -(25)	

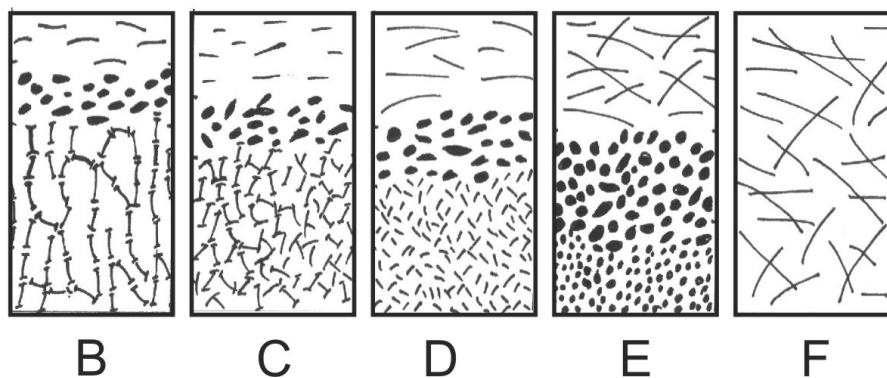


Figura 5 – **A.** Esquema general del apotecio parmeliáceo. **B. – F.** Esquemas generales del excípulo propio parmeliáceo: **B.** tipo I, **C.** tipo II, **D.** tipo III, **E.** tipo IV, **F.** tipo V.

Variabilidad del excípulo propio parmeliáceo

La variabilidad en la estructura y grosor de las distintas capas del excípulo propio permiten describir cinco tipos de apotecio parmeliáceo. Los esquemas de cada tipo se pueden comparar en la Fig. 5B-F:

Tipo I (Fig. 5B) representado por los géneros *Flavoparmelia* (Fig. 7), *Austroparmelina* (Fig. 8), *Flavopunctelia* (Fig. 9A, B), *Xanthoparmelia* (Fig. 10A-D), *Remototrachyna* (Fig. 11), *Cetrariastrum* (Fig. 17E, F) y *Everniastrum*. Las capas del excípulo propio en el corte de apotecio, desde arriba hacia abajo, tienen las siguientes características:

- capa hialina estrecha (10 – 20 μm) y formada por muy pocas hifas, de las que se aprecia en los cortes el lumen alargado y mucha matriz extracelular, que da precisamente el aspecto hialino a esta capa

- capa intermedia muy estrecha (5 μm) en *Remototrachyna adducta* (Fig. 11E) y estrecha (10 – 20 μm) en el resto de especies estudiadas, formada en la mayoría de los casos por 2 – 4 células de espesor con lumen muy ancho y teñidas intensamente

- capa basal mediana hasta ancha (25 – 50 μm) y muy ancha (hasta 70 - 75 μm) en *Flavoparmelia diffracta* (Fig. 7B), *Xanthoparmelia hottentotta* (Fig. 10C, D), *Everniastrum cirrhatum*, *Cetrariastrum ecuadoriense* (Fig. 17F) con cantidad excesiva de matriz extracelular entre las hifas (la distancia entre las hifas es de 5 - 10 μm). Las hifas de la capa basal tienen orientación vertical predominante aunque muy entrelazadas entre sí. Están formadas por células alargadas (5 μm x 2 μm) en forma de hueso (ver \rightarrow en Fig. 8B, D).

Tipo II (Fig. 5C) representado por la mayoría de los géneros estudiados, *Parmotrema* (Fig. 6A, B), *Crespoa* (Fig. 6F), *Punctelia* (Fig. 9C-E), *Xanthoparmelia* (Fig. 10E, F), *Bulbothrix* s. str. (Fig. 12C), "*Bulbothrix*" 1 (Fig. 12E, F), *Parmelinella* (Fig. 12D), *Everniastrum* (Fig. 15F), *Myelochroa* (Fig. 17C, D), *Nipponoparmelia* (Fig. 18A, B), *Parmelia* s. str. (Fig. 20), *Melanelixia* (Fig. 21A, B, F), *Melanohalea* (Fig. 21C, D), *Emodomelanelia* (Fig. 22A, B), *Pleurosticta* (Fig. 22C, D), "*Melanelia*" 1 (Fig. 22E, F), *Usnea* (Fig. 23A), *Cetraria* (Fig. 23B), *Melanelia* (Fig. 23C, D), *Pseudevernia* (Fig. 24A), *Hypogymnia* (Fig. 24E), *Brodoa* (Fig. 24F), *Imshaugia* y *Protoparmelia* (Fig. 25). Tiene las siguientes características:

- capa hialina estrecha (10 – 25 μm) en la mayoría de las especies, mediana (20 - 30 μm) en *Bulbothrix klementii* (Fig. 13C), *Nipponoparmelia laevior* (Fig. 18B), *Parmelia adaugescens* (Fig. 20B, F), "*Melanelia*" *tominii* (Fig. 22F) y *Cetraria crespoae* (Fig. 23B)

hasta ancha (40 – 50 μm) en *Melanelia stygia* (Fig. 23D), formada por muy pocas hifas, de las que se aprecia en los cortes el lumen alargado y mucha matriz extracelular, que le da aspecto hialino a la capa, excepto en género *Protoparmelia* (Fig. 25) donde es muy ancha (70 – 100 μm) y presenta muchas hifas horizontales.

- capa intermedia muy estrecha (5 – 10 μm) hasta estrecha (10 – 15 μm) formada por 2 - 5 células con lumen muy ancho y teñidas intensamente, excepto en *Melanelia stygia* (Fig. 23D) y *Protoparmelia* (Fig. 25F) donde es mas ancha (20 – 30 μm) y esta formada por 6 – 8 células.

- capa basal del escípulo propio de grosor estrecho (10 – 20 μm) en *Parmotrema nilgherense* (Fig. 6B), *Parmotrema andinum*, *Parmotrema abessinicum*, *Parmotrema hababianum*, *Xanthoparmelia conspersa* (Fig. 10F), *Xanthoparmelia exornata*, *Parmelinella wallichiana* (Fig. 13D), “*Bulbothrix*” *meizospora* (Fig. 13F), *Myelochroa* (Fig. 17D), *Parmelia cochleata* (Fig. 20C), mediano (20 – 40 μm) en la mayoría de especies, hasta ancho (40 - 50 μm) en *Crespoa inhaminensis*, *Parmelia omphalodes* (Fig. 20D), *Parmelia saxatilis*, “*Melanelia*” *tominii* (Fig. 22F), *Imshaugia aleurites*, *Brodoa atrofusca* (Fig. 24F) y género *Protoparmelia* (Fig. 25). Presenta mucha matriz extracelular entre las hifas (la distancia entre luces de las hifas es menor que en el tipo I, de 2 -7 μm). Las hifas de la capa basal no tienen orientación predominante y están muy entrelazadas entre si, formando una red coraloide. Están formadas por células con luces alargadas (5 μm x 2 μm) en forma de hueso. En la Fig. 20F se puede observar, que la distancia entre las hifas en esta capa no se debe al grosor de las paredes de las hifas (teñido de color morado más claro, P), sino a la presencia de una matriz extracelular (teñido de morado, M).

Tipo III (Fig. 5D) representado por *Parmotrema* (Fig. 6C-E), *Flavopunctelia*, *Canoparmelia* s. str. (Fig. 9F), *Parmelinopsis* (Fig. 14A, B), *Hypotrachyna revoluta* (Fig. 15A, B), “*Hypotrachyna*” 1 (Fig. 16A-D), “*Hypotrachyna*” 2 (Fig. 16E, F), *Everniastrum*, *Relicina* (Fig. 18C, D), *Relicinopsis* (Fig. 18E, F), *Parmelia* s. str. (Fig. 20A-B), *Melanohalea* (Fig. 21E), *Pseudevernia* (Fig. 24B), *Arctoparmelia* (Fig. 24C, D). Tiene las siguientes características:

- capa hialina desde muy estrecha (5 - 10 μm) en *Melanohalea subolivacea* pasando por estrecha (10 – 20 μm) y mediana (20 – 30 μm) en la mayoría de especies. Está formada por muy pocas hifas, de las que se aprecia en los cortes el lumen alargado y mucha matriz extracelular, que le da aspecto hialino a la capa.

- capa intermedia muy estrecha (5 - 10 μm) en *Parmelinopsis horrescens* (Fig. 14B), *Hypotrachyna revoluta* (Fig. 15B) y *Arctoparmelia centrifuga* (Fig. 24D), estrecha hasta mediana (10 - 25 μm) en resto de las especies, formada por muy pocas células (1 – 2) de

anchura en *Parmelinopsis horrescens* (Fig. 14B) y por 3 – 6 células con lumen ancho y teñidas intensamente en resto de las especies.

– capa basal del escípulo propio es estrecha (10 - 20 μm) en *Parmotrema thompsonii* (Fig. 6D), *Parmelinopsis horrescens* (Fig. 14B), “*Hypotrachyna*” *revoluta* (Fig. 15B), “*Hypotrachyna*” *physcioides* (Fig. 16B), “*Hypotrachyna*” *reducens* (Fig. 16D), “*Hypotrachyna*” *fissicarpa* (Fig. 16F), y mediana (20 - 30 μm) en el resto de las especies, con poca matriz extracelular entre las hifas (la distancia entre las hifas es de 2 - 7 μm). Las hifas de esta capa no tienen orientación predominante y están muy entrelazadas entre si. Están formadas por células más cortas (3 μm x 2 μm) que en los dos tipos anteriores.

Tipo IV (Fig. 5E) representado por *Bulbothrix* s. str. (*B. coronata*) (Fig. 12A, B), *Parmelina* (Fig. 13), *Parmelinopsis neodamaziana* (Fig. 14E, F), *Hypotrachyna* s. str. (Fig. 15C-E), *Parmeliopsis* (Fig. 17A, B) tiene siguientes características:

– capa hialina desde mediana hasta ancha (20 – 40 μm) y con las hifas de orientación horizontal predominante.

– capa intermedia mediana (15 - 20 μm), formada por 4 - 6 (hasta 8 en *Hypotrachyna osseoalba*, Fig. 15D) células con lumen ancho casi redondo. En el caso de *Bulbothrix coronata* (Fig. 12B), *Parmelinopsis neodamaziana* (Fig. 14F) *Parmeliopsis* (Fig. 17B) es muy estrecha (5 - 10 μm) y presenta 2 - 3 células.

– capa basal estrecha (10 – 20 μm) hasta mediana (20 – 25 μm) en *Parmelina atricha* y *P. coleae* con muy poca matriz extracelular entre las hifas (la distancia entre las hifas es de 1 – 3 μm). Las hifas de esta capa están formadas por células de luces cortas y casi redondas (2 - 2,5 μm x 2 μm). En las imágenes de MCF (microscopía confocal de fluorescencia) de *Parmelina quercina* se observa que en esta parte del excípulo propio, los núcleos están distribuidos homogéneamente, recordando así el tejido paraplectenquimático (Fig. 4E, F).

Tipo V (Fig. 5F) del apotecio parmeliáceo está presente en los géneros *Notoparmelia* (Fig. 19) y *Platismatia* (Fig. 23E, F). El excípulo propio está compuesto por una capa, la capa hialina fuertemente desarrollada. En ninguna especie estudiada de los dos géneros mencionados se encontró una capa basal tal como esta descrita en los cuatro tipos anteriores. La zona entre el subhimenio y la capa algal está formada exclusivamente por una capa hialina de entre 30 y 80 μm de grosor con hifas muy largas sin ninguna orientación predominante.

Estructuras peculiares

La anatomía de capa basal del excípulo propio coincide con la anatomía del córtex del excípulo talino y así a la vez con el del córtex superior del talo. Incluso en las especies que presentan córtex superior tipo abovedado (“vaulted cortex”; Hale 1985), que no es constante en grosor sino que varía en distintas zonas aproximadamente desde 20 μm hasta 100 μm , la capa basal presenta las mismas características. Esto se observa especialmente en *Xanthoparmelia hottentotta* (Fig. 10C, D), *Flavoparmelia diffractaica* (Fig. 7A), *F. marchantii* y *Parmelina carporrhizans*.

En algunas de las especies observadas se han encontrado unas estructuras peculiares, típicas solo de una o dos especies, sin poder adjudicarles importancia como carácter sistemático. Su uso como carácter discriminante para dicha especie tiene que ser estudiado más profundamente. Por ejemplo, en *Everniastrum rhizodendroidum* (Fig. 15D), *E. cirrhatum*, *Cetrariastrum ecuadoriense* (Fig. 17E, F), *C. andense*, *Xanthoparmelia delisei* (Fig. 10E) y *Nipponoparmelia laevior* (Fig. 18A, B) la capa intermedia está melanizada, asemejándose al color del córtex del talo. En *Hypotrachyna revoluta* (Fig. 15B) la capa intermedia es brillante, asemejándose al córtex superior incrustado por algunos extrolitos. En otras especies, como *Remototrachyna scytophylla* (Fig. 11F), *Protoparmelia badia* (Fig. 25C, D) y *Protoparmelia rhombosporea* (Fig. 25E) la capa basal del excípulo propio es reluciente, lo que dificulta el estudio de su estructura, y es muy parecida al córtex superior.

Además se encontraron manchas oscuras en las partes distales del excípulo propio en *Parmelina* y en algunas especies de *Parmotrema*. Estas zonas melanizadas se pueden observar en el apotecio bajo la lupa como un círculo marrón oscuro casi negro alrededor del disco apotecial. En los cortes transversales del apotecio se distingue claramente una mancha marrón en los extremos distales del excípulo propio (ver flecha en la Fig. 13). Este carácter es constante en todas las especies del género *Parmelina* y su ausencia fue utilizada como uno de los caracteres morfológicos discriminantes del género *Austroparmelina* (Crespo *et al.* 2010a). Para encontrar el significado de dicho carácter en el género *Parmotrema* es imprescindible hacer un estudio sistemático de los apotecios de todas las especies fértiles del género, continuado con el estudio filogenético molecular.

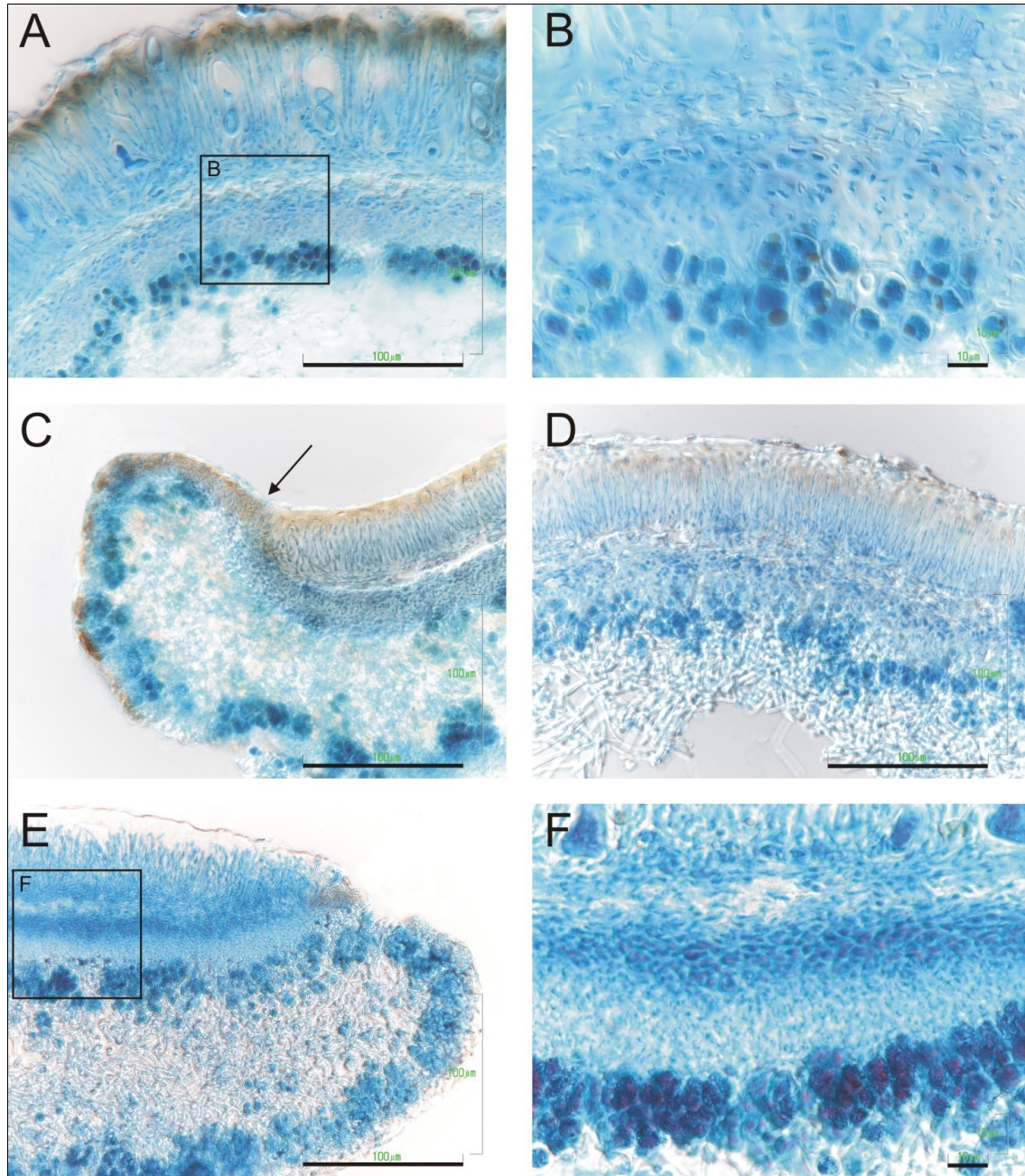


Figura 6 – **A. - B.** *Parmotrema nilgherrense* con tipo II de excípulo propio y con capa basal estrecha. **C.** *P. reticulatum* con tipo III de excípulo propio. Se puede observar la continuación del excípulo propio en excípulo talino (→). **D.** *P. perlatum* con tipo III de excípulo propio. **E. - F.** *P. thompsoni* con tipo III de excípulo propio. **A. & C. - E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm. *Crespoa schelpei* con tipo II de excípulo propio.

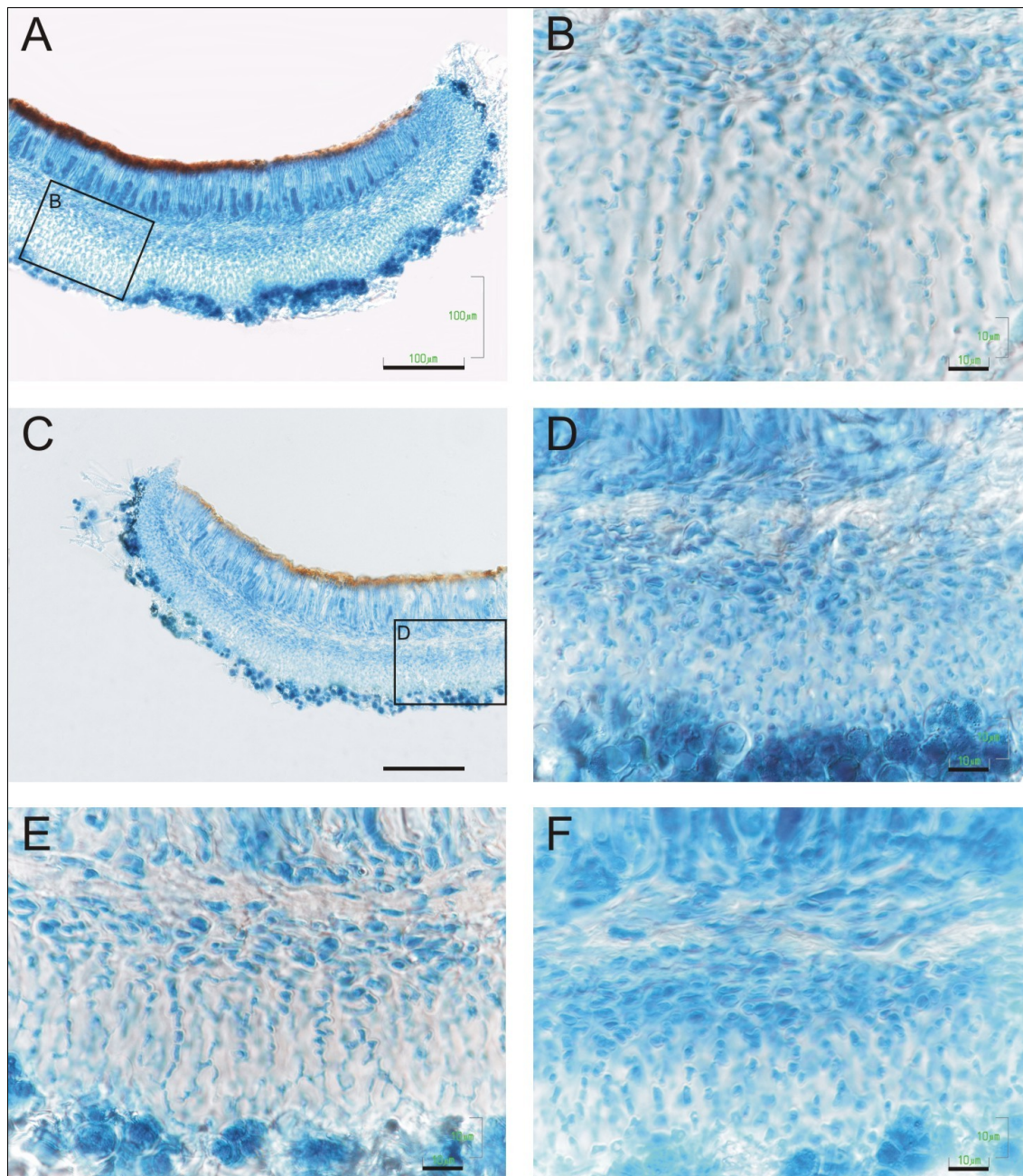


Figura 7 – Género *Flavoparmelia*, tipo I del excípulo propio de apotecio parmeliáceo. **A.** - **B.** *F. diffractaica* con capa basal muy ancha. **C.** - **D.** *F. virensica*. **E.** *F. ferax*. **F.** *F. rutidota*. **A. & C.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm. **B. & D. - F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm.

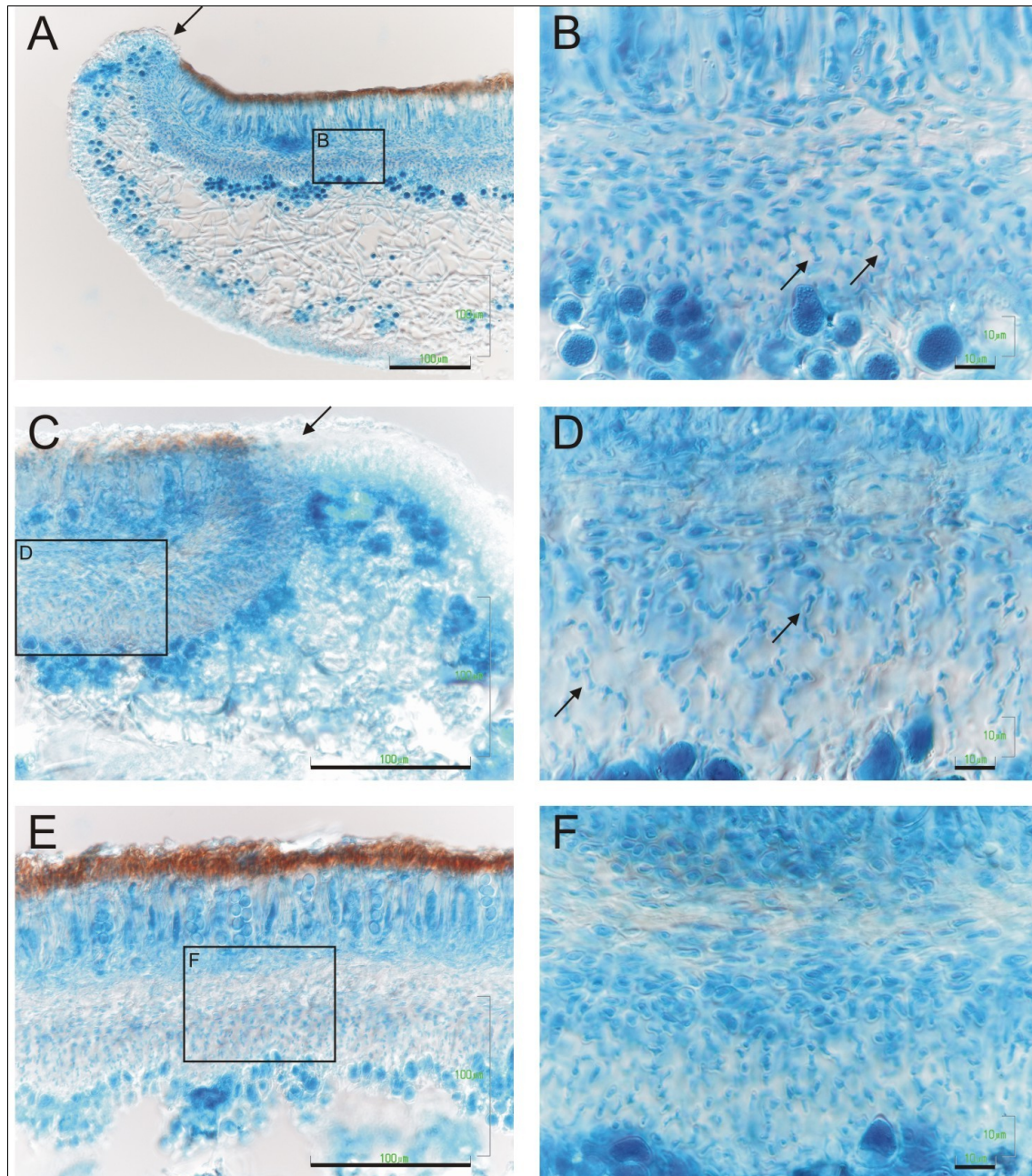


Figura 8 – Género *Austroparmelina*, tipo I del excípolo propio de apotecio parmeliáceo. **A.** - **B.** *A. endoleuca*. **C.** - **D.** *A. pruinata*. En **A.** y **C.** se observa la continuación del excípolo propio en excípolo talino (→). **E.** - **F.** *A. norpruinata*. **A.** & **C.** & **E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B.** & **D.** & **F.** Detalle del excípolo propio. Escala = 10 µm. En **B.** y **D.** las flechas (→) señalan las hifas en forma de hueso.

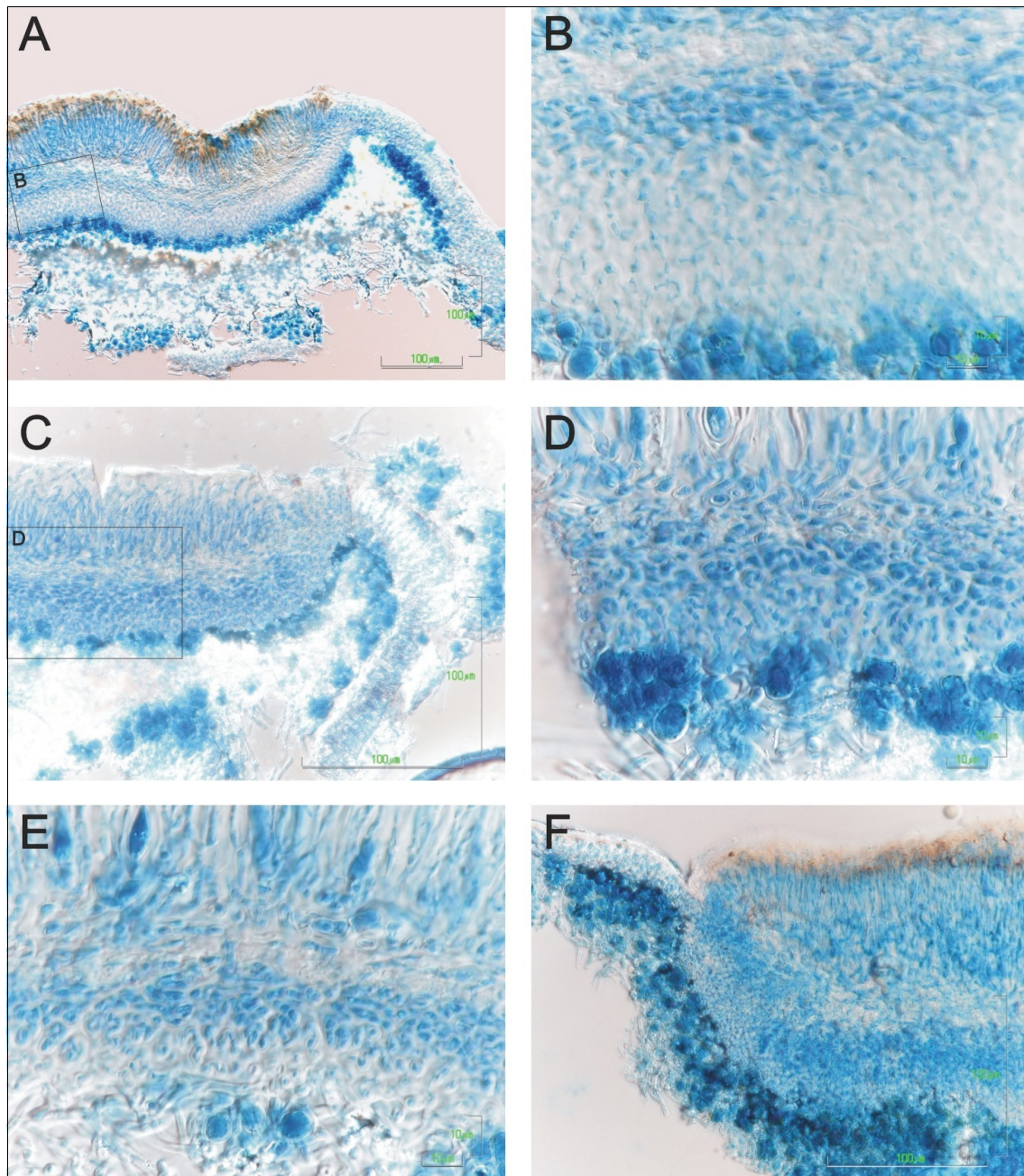


Figura 9 – A. - B. *Flavopunctelia darrowii* con tipo I de excípulo propio. **C. - D.** *Punctelia subflava* con tipo II de excípulo propio. En **A.** y **C.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. **E.** *P. hypoleucites* con tipo II de excípulo propio. **F.** *Canoparmelia texana* con tipo III de excípulo propio. **A. & C. & F.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. & D. - E.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

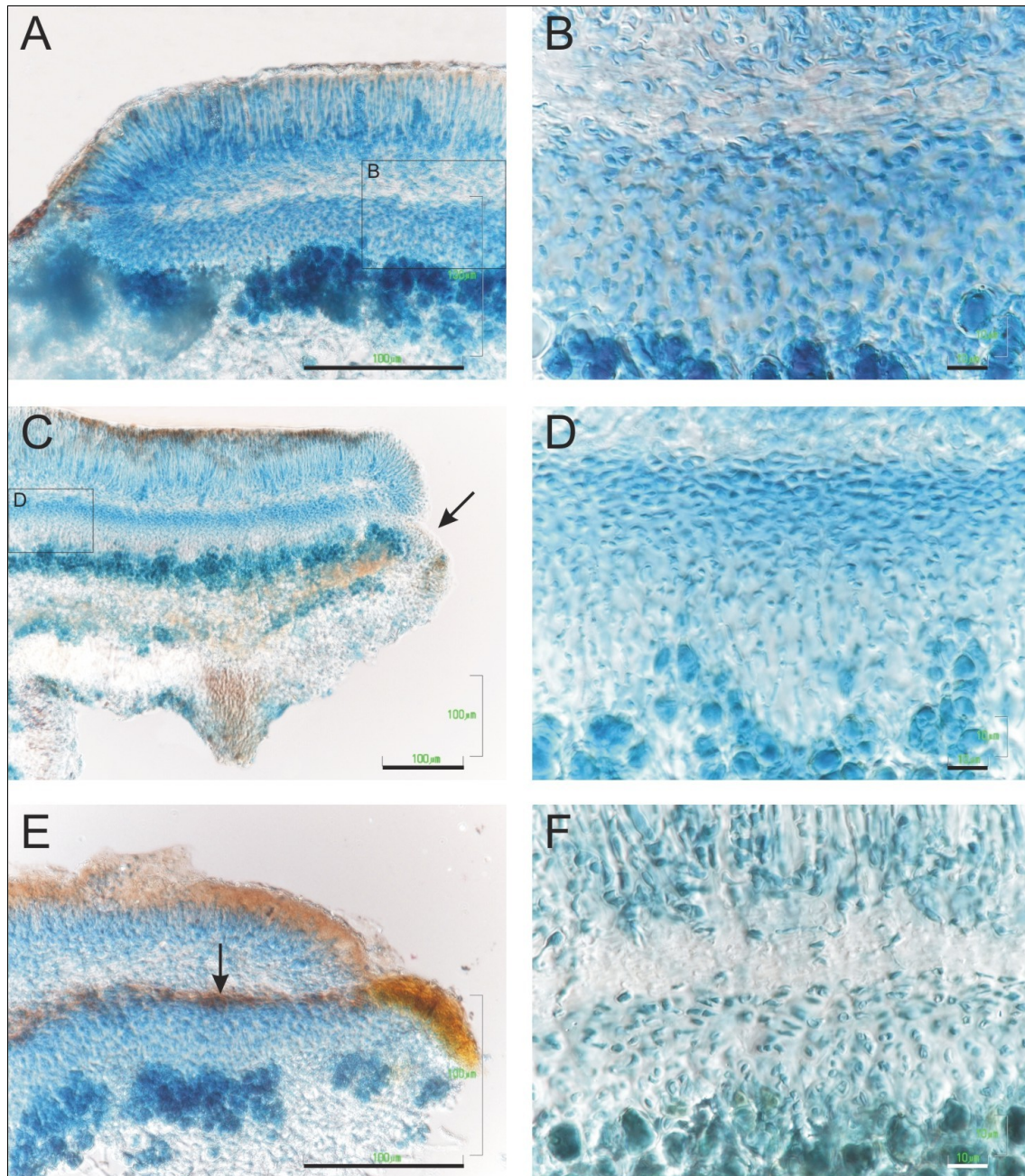


Figura 10 – Género *Xanthoparmelia*, tipo I y II del excípulo propio de apotecio parmeliáceo. **A. - B.** *X. mexicana* con tipo I de excípulo propio. **C. - D.** *X. hottentotta* con tipo I de excípulo propio y capa basal muy ancha y de tipo abovedado. En **A.** y **C.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. **E.** *X. delisei* con tipo II de excípulo propio. La capa intermedia esta parcialmente melanizada (→). **F.** *X. conspersa* con tipo II de excípulo propio. **A. & C. & E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. & D. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

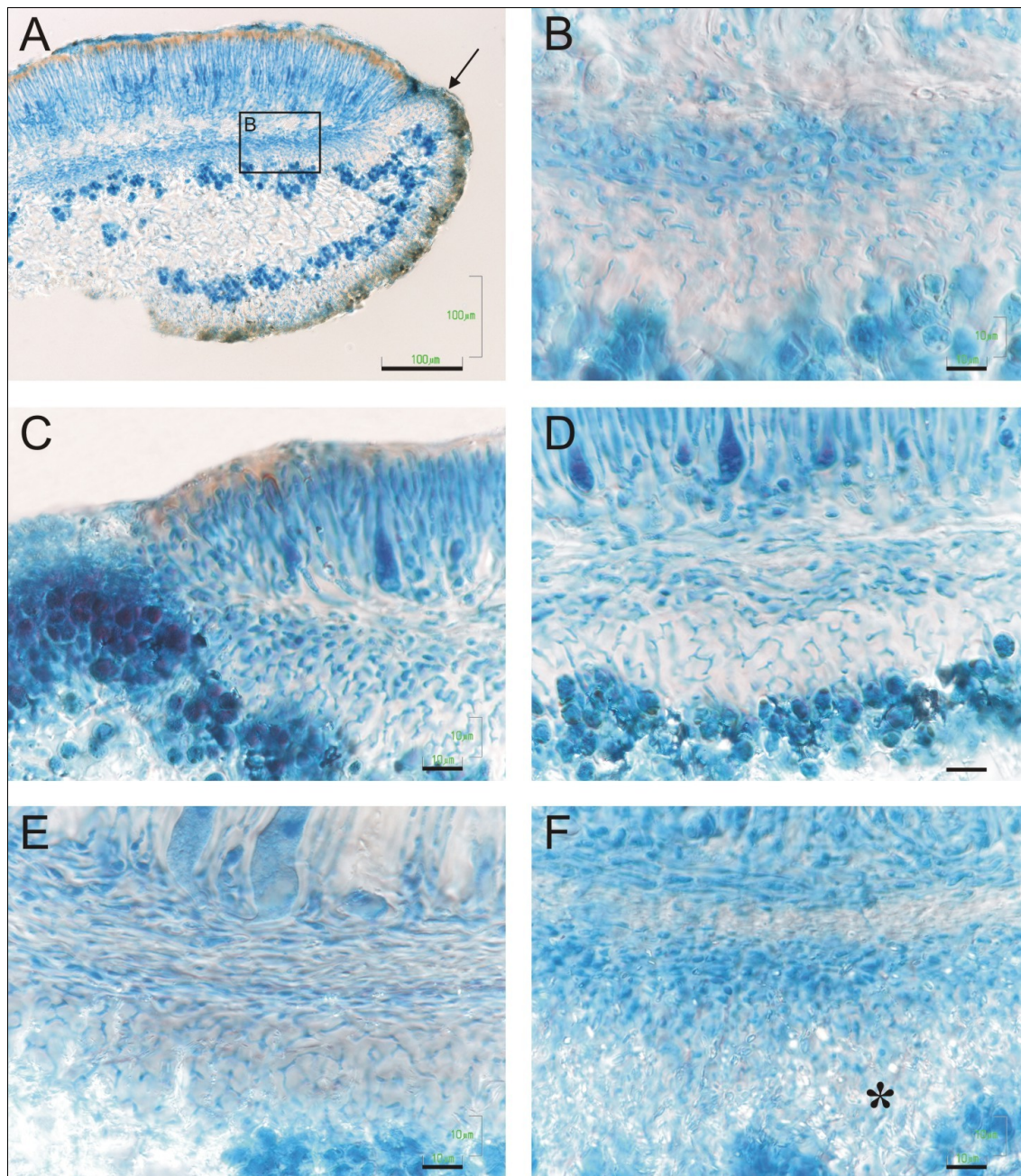


Figura 11 – Género *Remototrachyna*, tipo I del excípulo propio de apotecio parmeliáceo. **A. - B.** *R. flexilis*. **C. - D.** *R. kingii*. En **A.** y **C.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino (→). **E.** *R. adducta* con capa intermedia muy estrecha. **F.** *R. scytophylla* con capa basal reluciente por presencia de extrolitos (*). **A.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm. **B. - F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm.

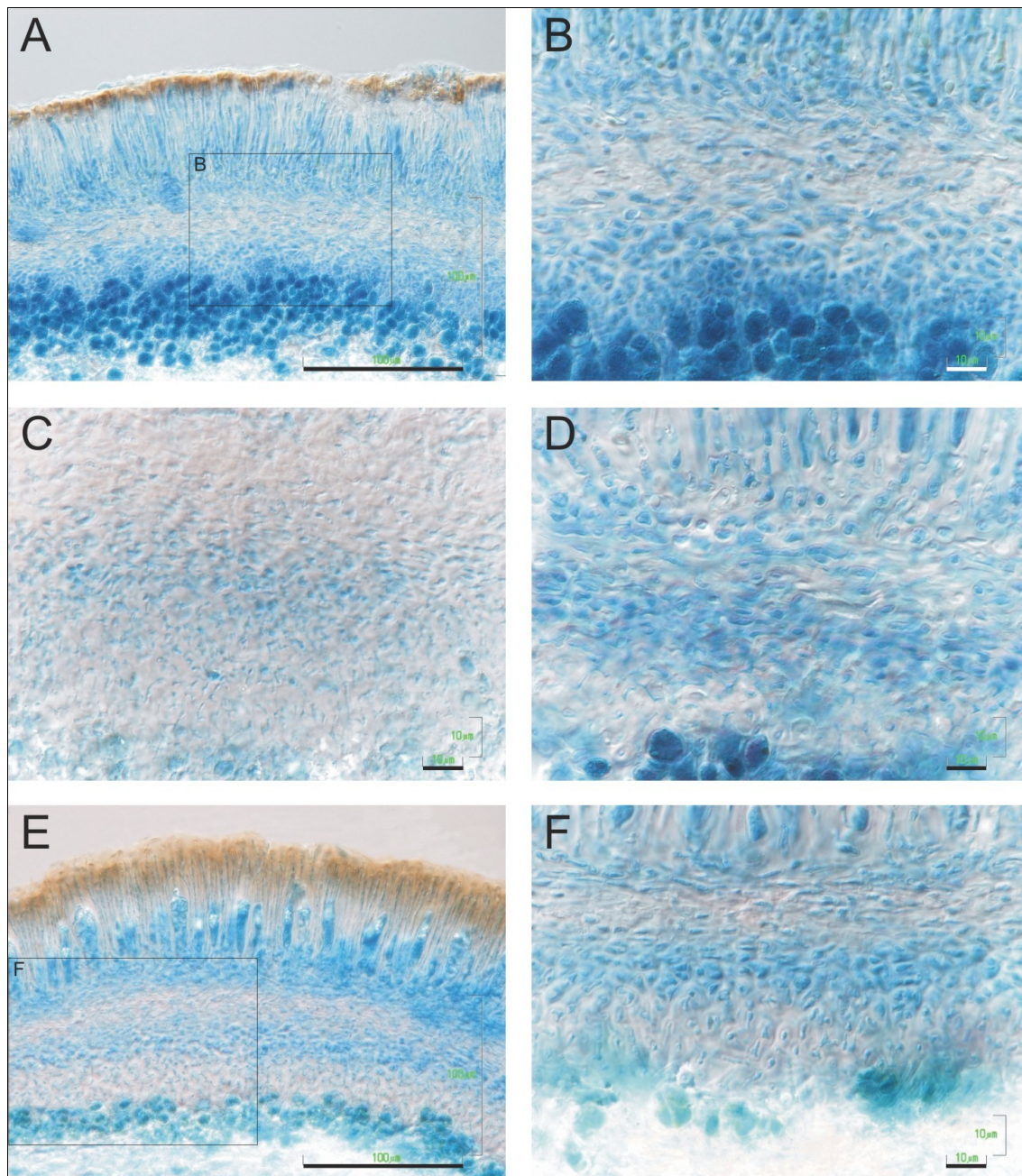


Figura 12 – **A. - B.** *Bulbothrix coronata* con tipo IV de excípulo propio y intermedia muy estrecha. **C.** *B. klementii* con tipo II de excípulo propio. **D.** *Parmelinella wallichiana* con tipo II de excípulo propio. **E.** “*Bulbothrix*” *setschwanensis* con tipo II de excípulo propio. **F.** “*B.*” *meizospora* con tipo II de excípulo propio. **A. & E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. - D. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

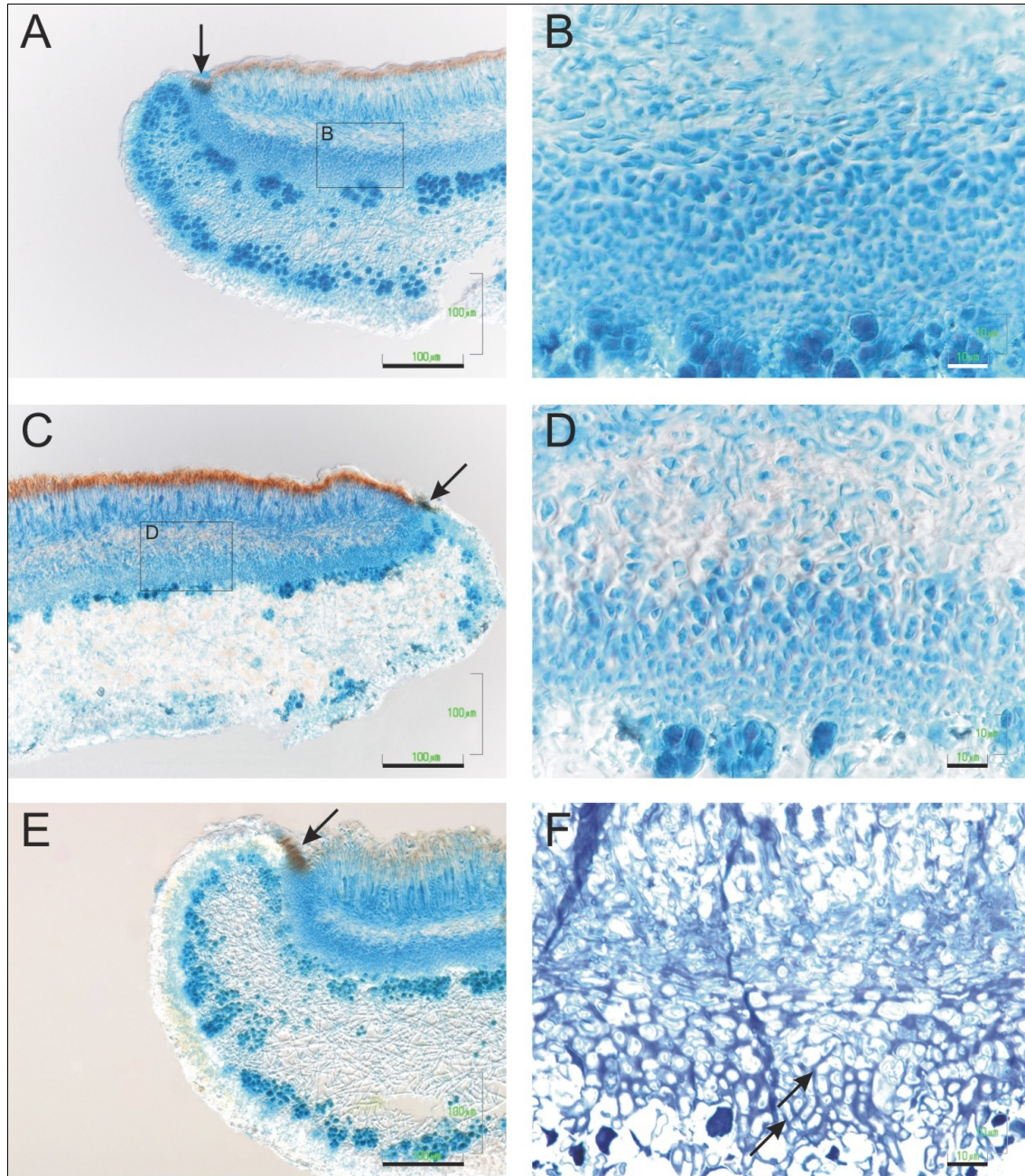


Figura 13 – Género *Parmelina*, tipo IV del excípulo propio de apotecio parmeliáceo. **A. - B.** *P. quercina*. **C. - D.** *P. coleae*. **E. - F.** *P. carporrhizans*. **A. & C. & E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. La flecha (→) señala la mancha melanizada en la parte distal del excípulo propio, típica para el género. A pesar de la mancha se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. Escala = 100 μm . **B. & D.** Detalle del excípulo propio. **F.** Detalle del excípulo propio en el corte semifino. Las flechas (→) señalan el espacio entre las hifas, formado por poca matriz extracelular. Escala = 10 μm .

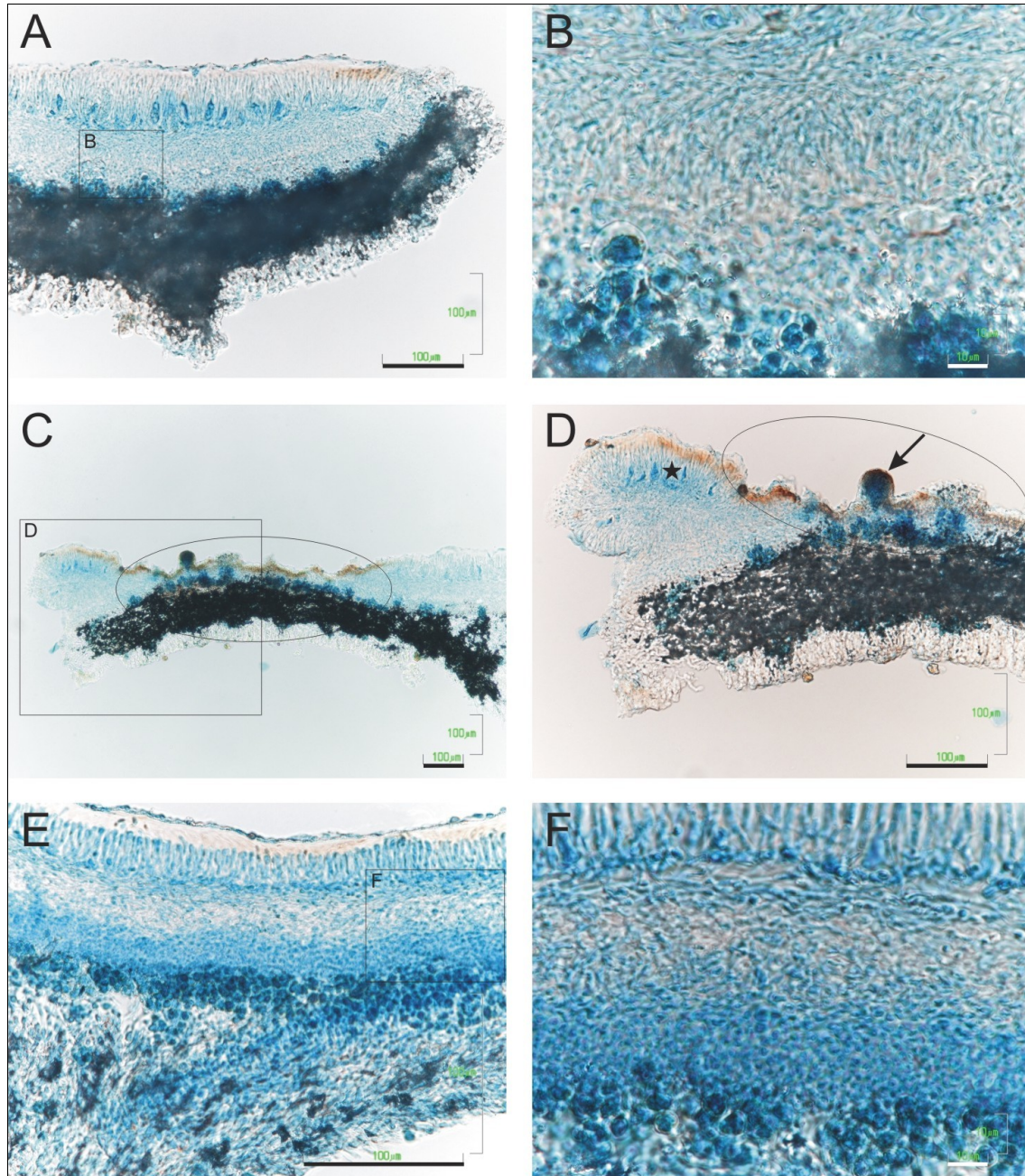


Figura 14 – Género *Parmelinopsis*, tipo III y IV de excípulo propio. **A. - D.** *P. horrescens* con tipo III de excípulo propio. En **A.** y **D.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. En **C.** y **D.** la elipse señala la zona degradada del himenio. En **D.** la flecha (→) señala el isidio desarrollado en la zona degradada del himenio. **E. - F.** *P. neodamaziana* con tipo IV de excípulo propio. **A. & C. - E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

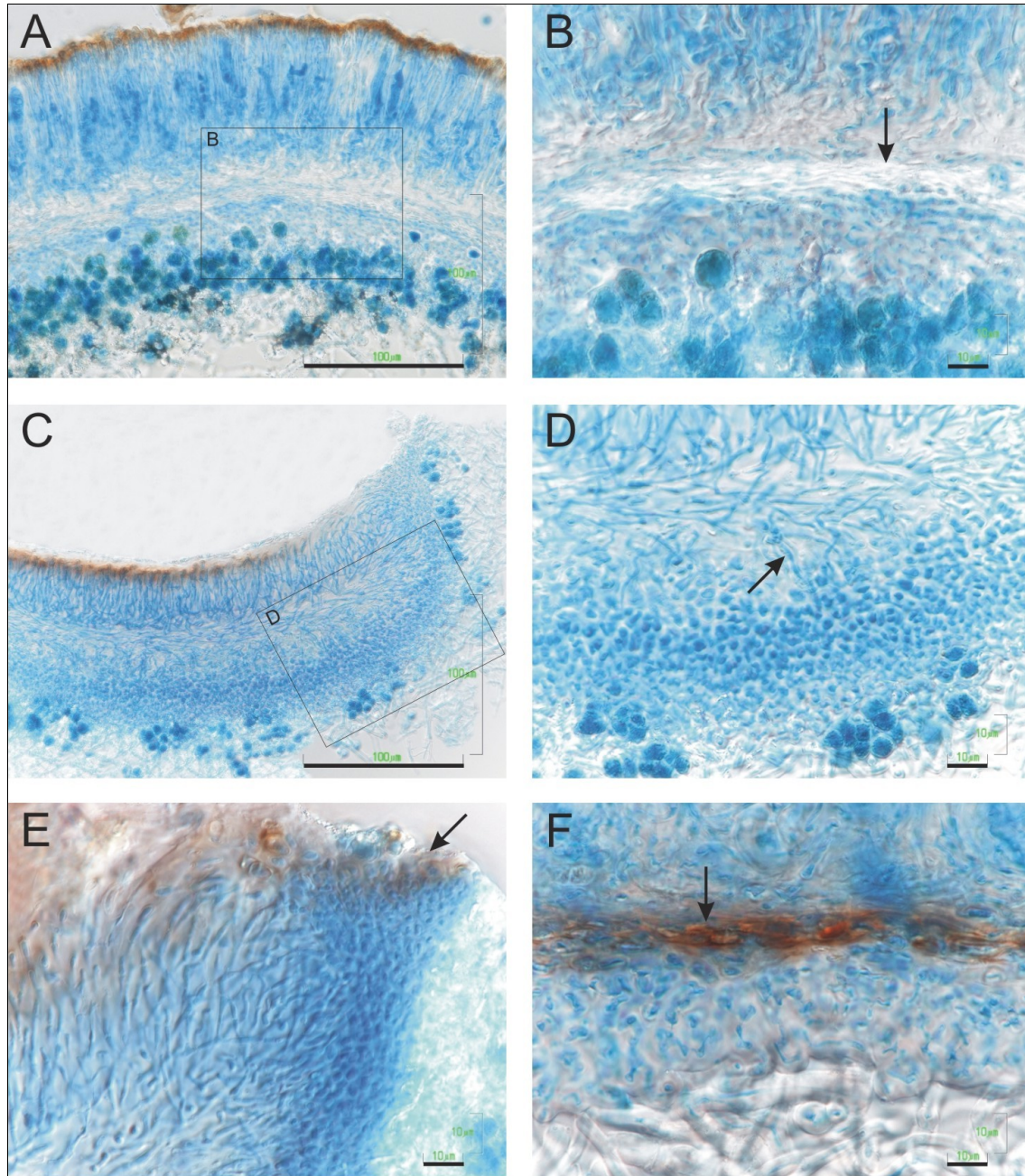


Figura 15 – A. - B. “*Hypotrachyna*” *revoluta* con tipo III de excípulo propio, capa intermedia reluciente (→) por presencia de extrolitos y capa basal estrecha. **C. - E.** *Hypotrachyna osseoalba* con tipo IV de excípulo propio. En **D.** la flecha señala las hifas de la capa hialina que interconectan el subhimenio con la estructura basal del excípulo propio. En **E.** la flecha señala la mancha melanizada en la parte distal del excípulo propio en la superficie. **F.** *Everniastrum rhizodendroide* con tipo II de excípulo propio y capa intermedia melanizada (→). **A. & C.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. & D. - F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

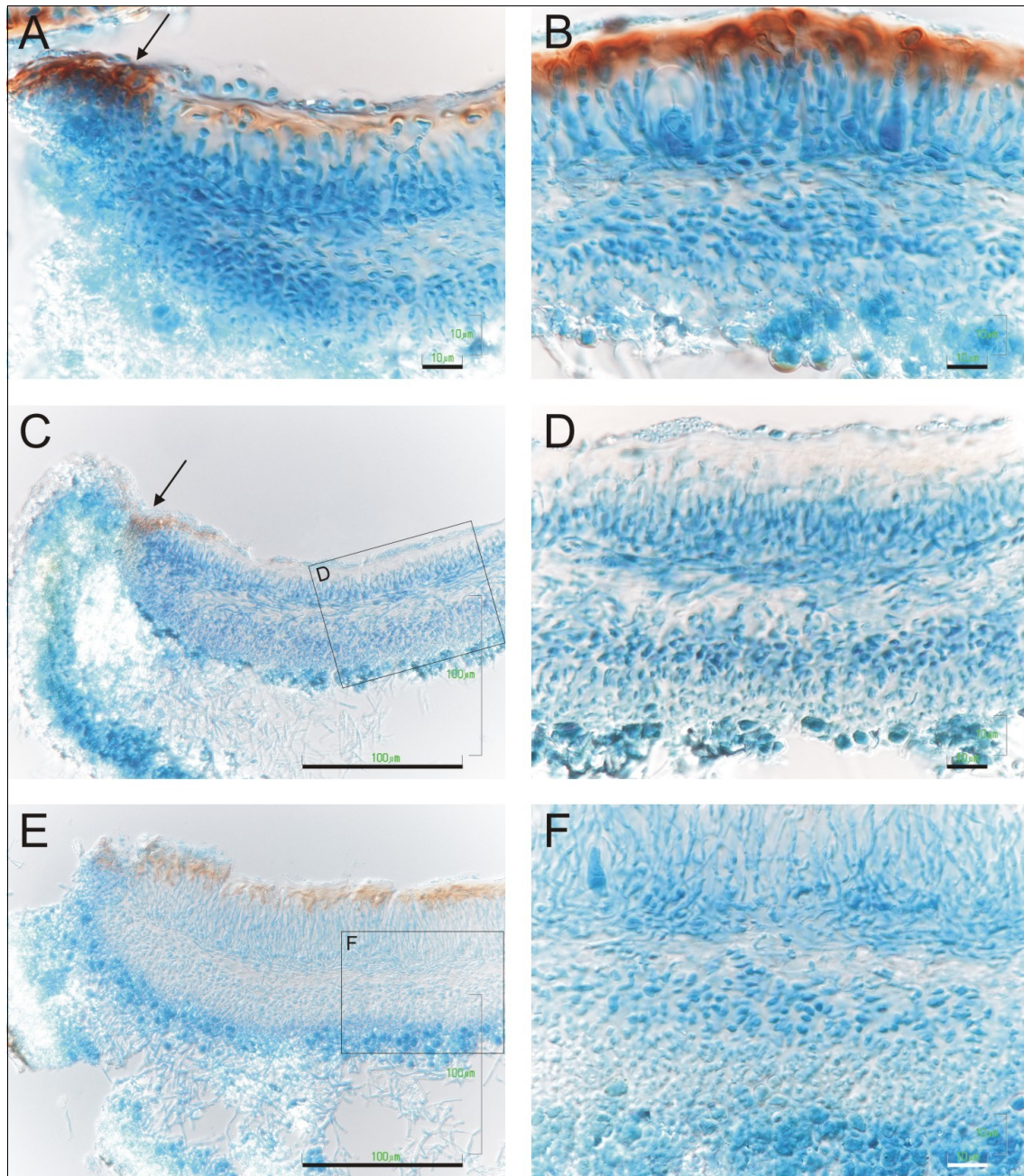


Figura 16 – Género “*Hypotrachyna*” 2, tipo III de excípulo propio y capa basal estrecha. A. - B. “*H*”. *physcioides*. C. - D. “*H*”. *reducens*. E. - F. “*H*”. *fissicarpa*. C. & E. Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. La flecha señala la mancha melanizada en la parte distal del excípulo propio en la superficie. Escala = 100 µm. A - B. & D. & F. Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

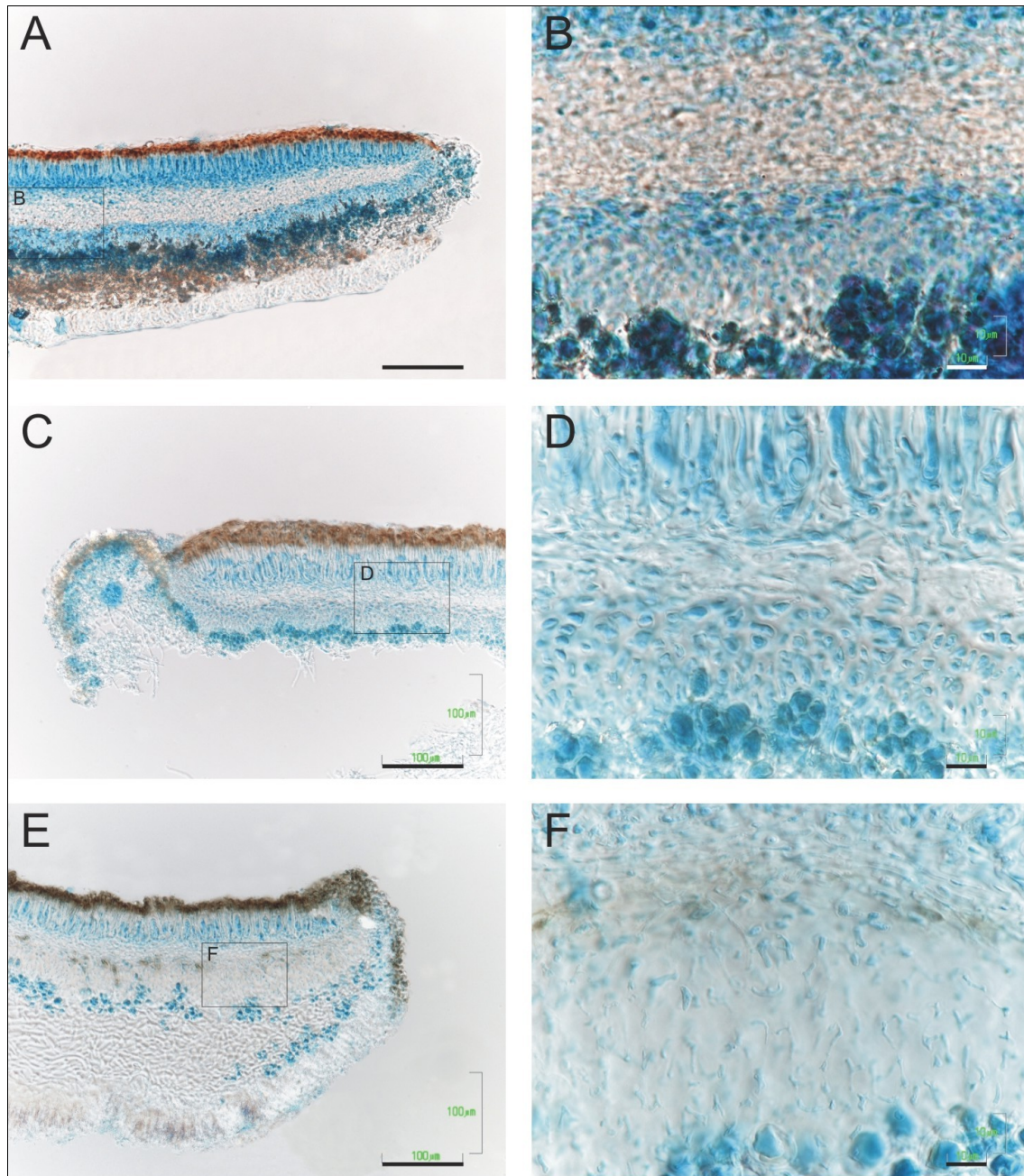


Figura 17 – A. - B. *Parmeliopsis ambigua* con tipo IV de excípulo propio. C. - D. *Myelochroa aurulenta* con tipo II de excípulo propio. E. - F. *Cetrariastrum ecuadoriense* con tipo I de excípulo propio y capa intermedia parcialmente melanizada. En C. y E. se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. A. & C. & E. Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. B. & D. & F. Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

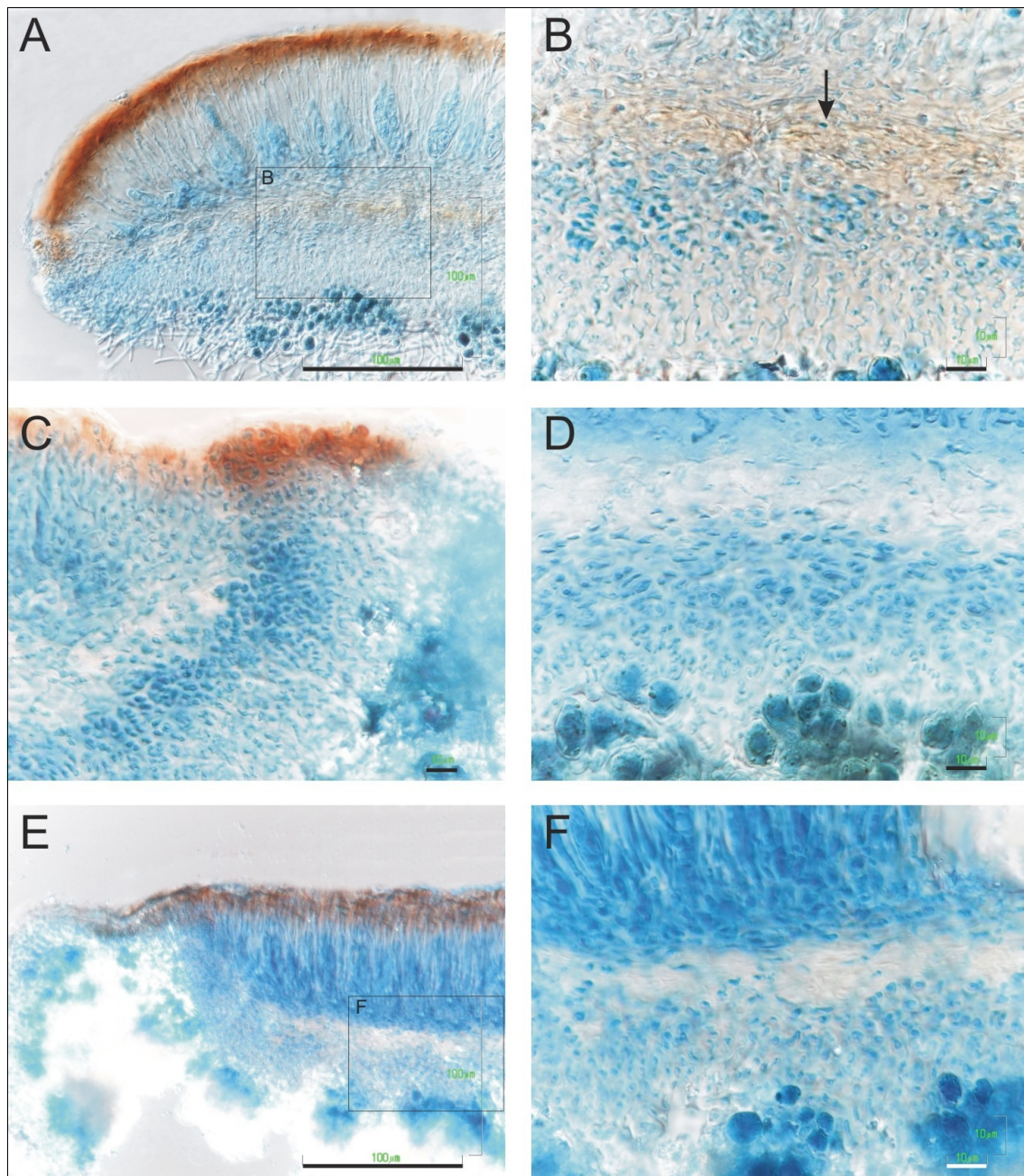


Figura 18 – **A. - B.** *Nipponoparmelia laevior* con tipo II de excípulo propio y capa hialina algo melanizada. **C. - D.** *Relicina limbata* con tipo III de excípulo propio. **E. - F.** *Relicinopsis intertexta* con tipo III de excípulo propio. **A. & E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. - D. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

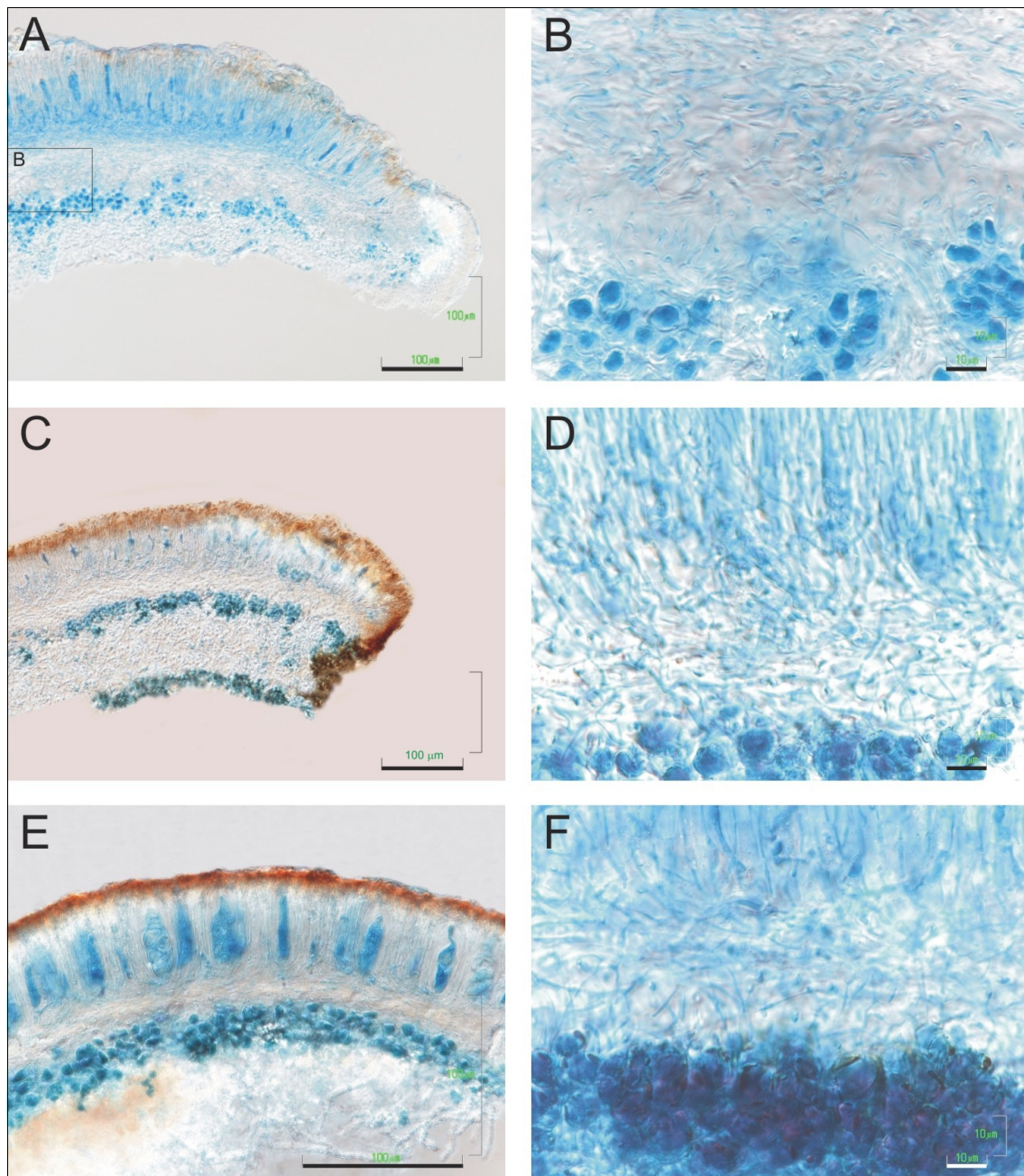


Figura 19 – Género *Notoparmelia*, tipo V del excípulo propio de apotecio parmeliáceo, compuesto sólo por la capa hialina. **A. - B.** *N. tenuirima*. **C.** *N. signifera*. **D.** *N. erumpens*. **E.** *N. crambidiocarpa*. **F.** *N. subtestacea*. **A. & C. & E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm. **B. & D. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm.

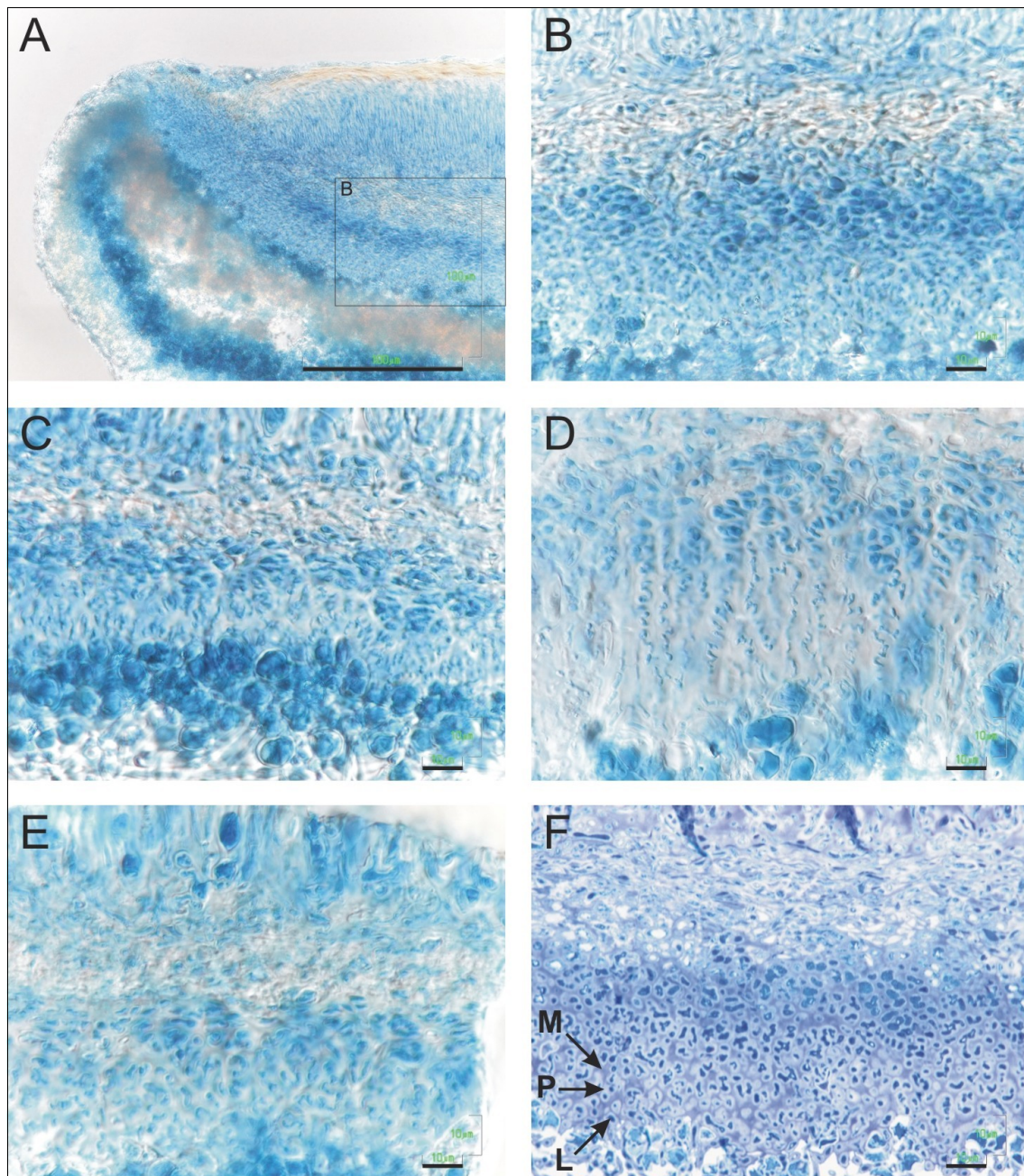


Figura 20 – Género *Parmelia* s. str., tipo II del excípulo propio de apotecio parmeliáceo. **A.** - **B.** *P. adaugescens*. En **A.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. **C.** *P. cochleata* con capa basal estrecha. **D.** *P. opmphalodes* con capa basal ancha. **E.** *P. sulcata*. **F.** *P. adaugescens*, donde podemos observar lumen (L) de las hifas teñido de morado oscuro y la pared (P) de las hifas teñida de blanco. La pared (P) está relativamente estrecha, así que las distancias entre las hifas no se deben al grosor de las paredes sino al volumen de la matriz (M) extracelular teñida de morado claro. **A.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B.** - **F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

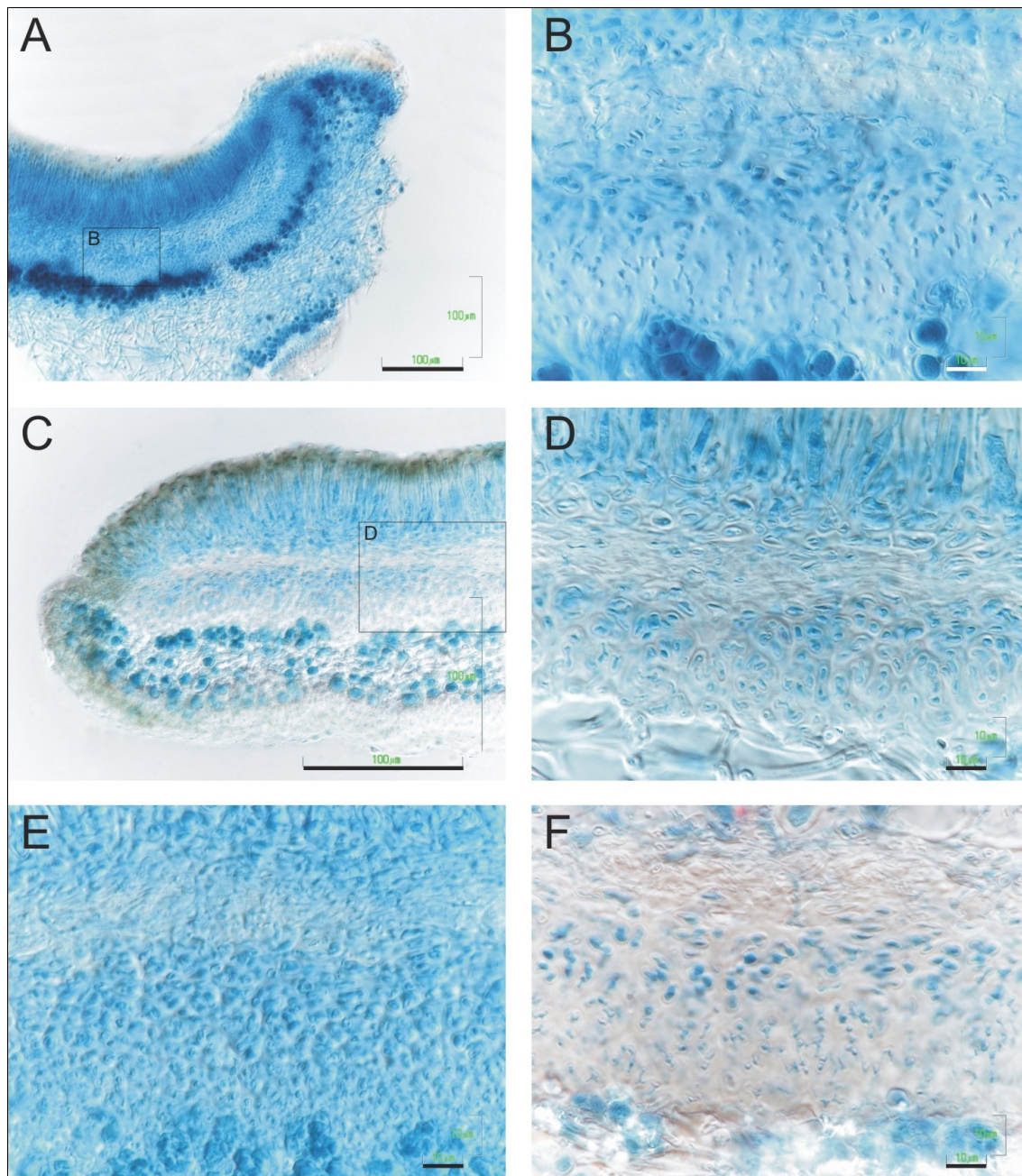


Figura 21 – **A. - B.** *Melanelixia glabra* con tipo II de excípulo propio. **C. - D.** *Melanohalea subelegantula* con tipo II de excípulo propio. En **A.** y **C.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. **E.** *Melanohalea elegantula* con tipo III de excípulo propio. **F.** *Melanelixia calva* con tipo II de excípulo propio. **A. & C.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm. **B. & D. - F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm.

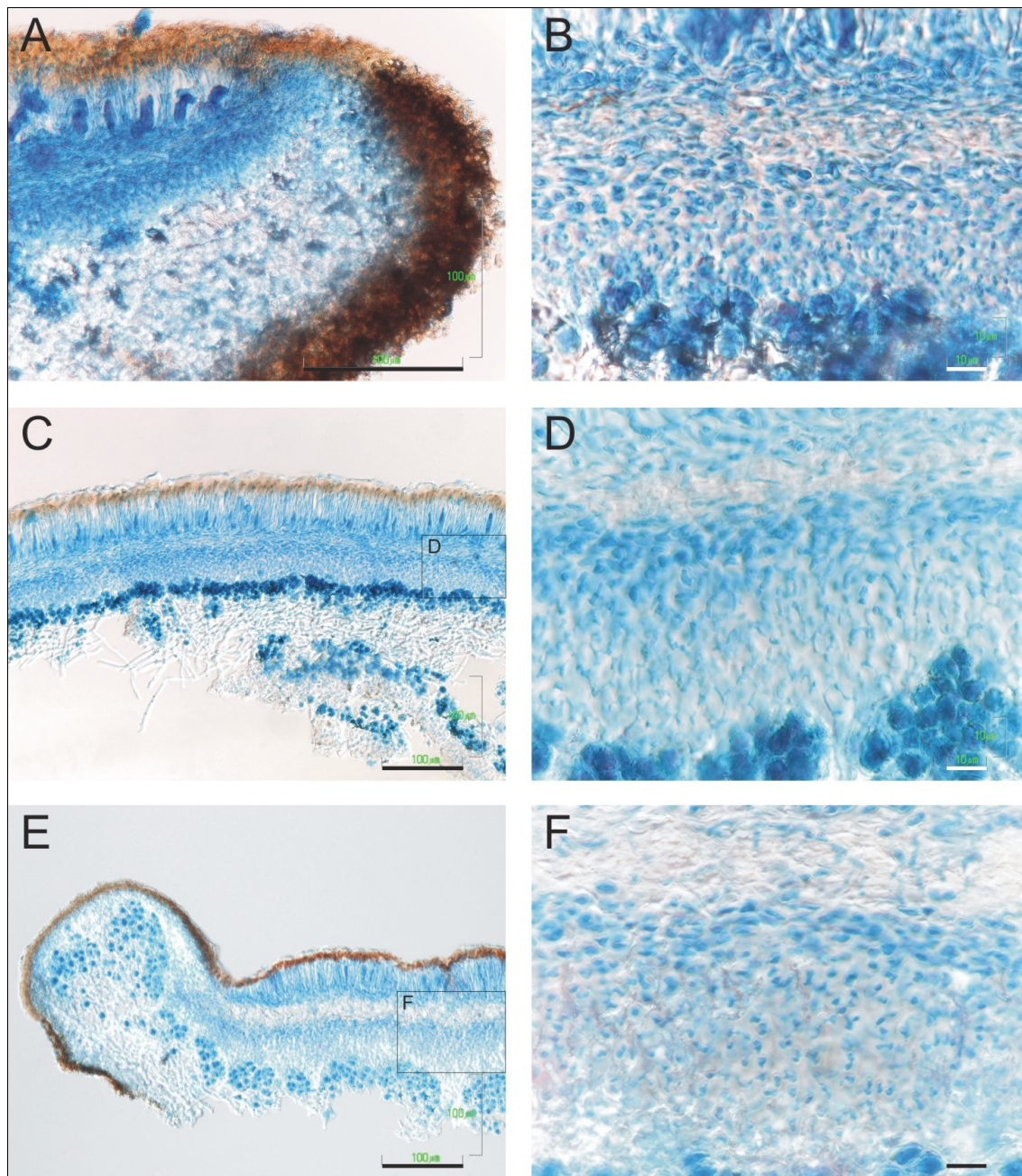


Figura 22 – **A. - B.** *Emodomelanelia masonii* con tipo II de excípulo propio. **C. - D.** *Pleurosticta acetabulum* con tipo II de excípulo propio. **E. - F.** “*Melanelia*” *tominii* con tipo II de excípulo propio. En **A.** y **E.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. **A. & C. & E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm. **B. & D. & F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 µm.

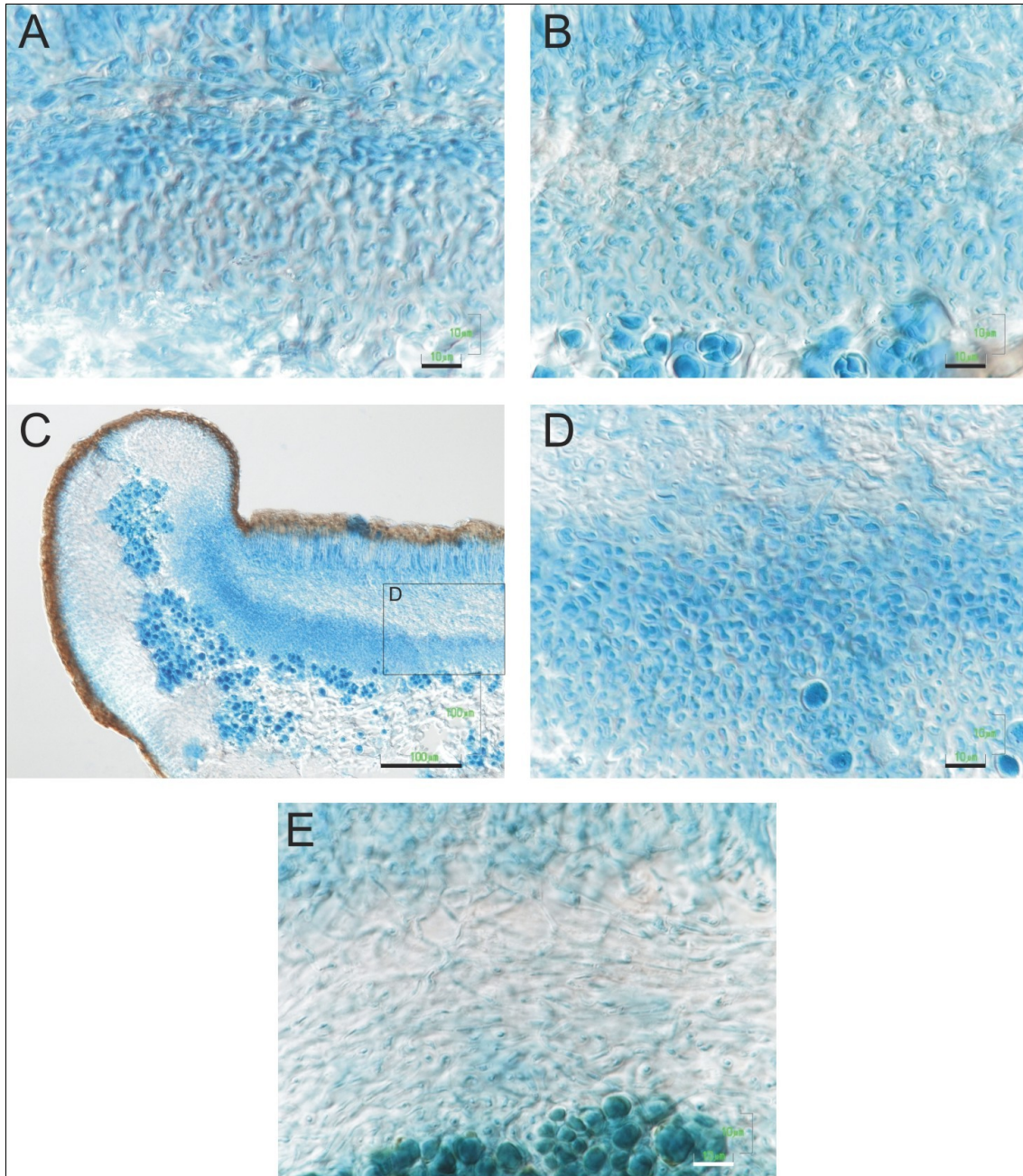


Figura 23 – **A.** *Usnea florida* con tipo II de excípulo propio. **B.** *Cetraria crespoae* con tipo II de excípulo propio. **C. - D.** *Melanelia stygia* con tipo II de excípulo propio y capa hialina muy ancha. En **C.** se observa la continuación del excípulo propio en excípulo talino. **E.** *Platismatia glauca* con tipo V de excípulo propio. **C.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm . **A., B., D & E.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm .

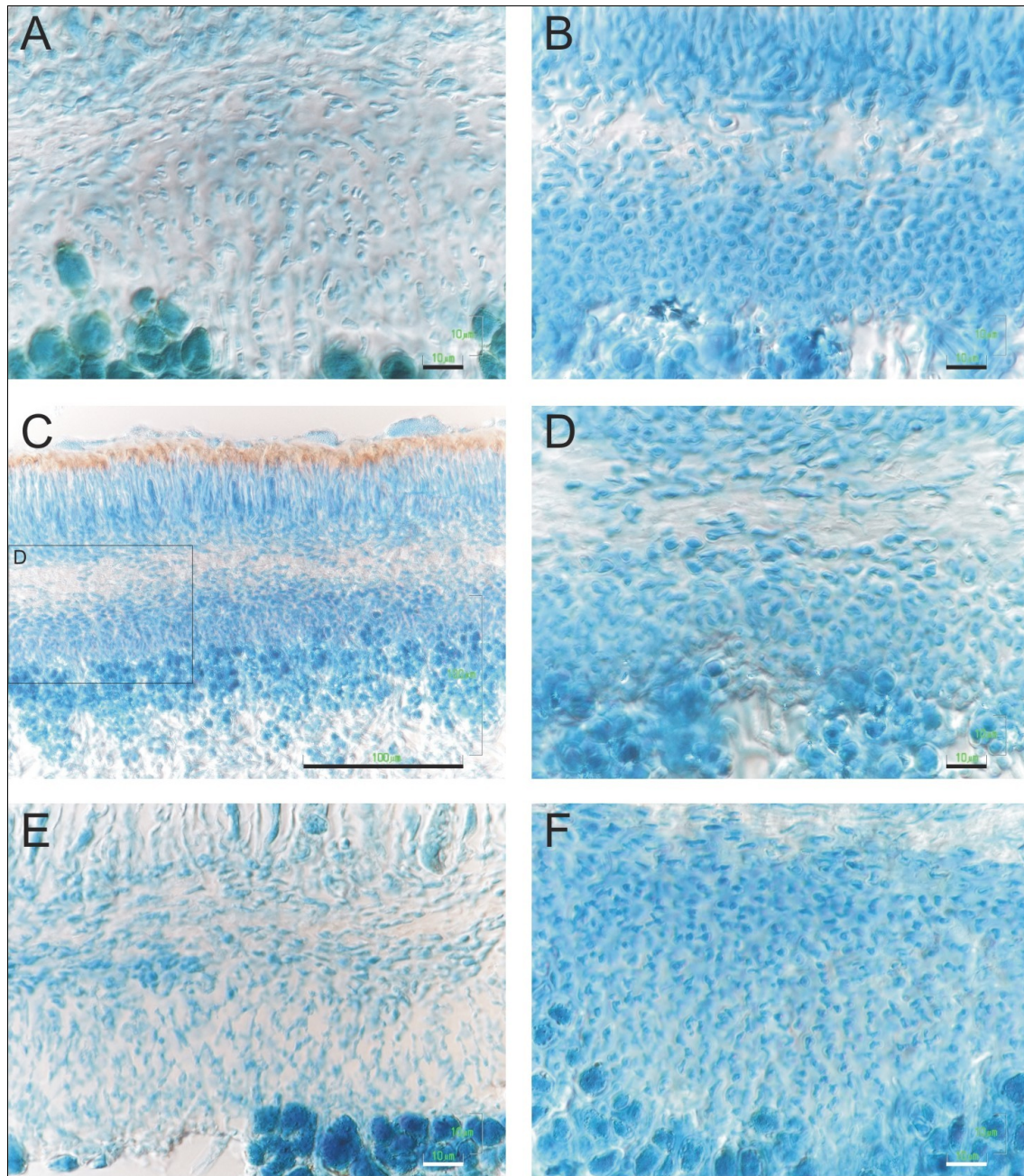


Figura 24 – **A.** *Pseudevernia furfuracea* con tipo II de excípulo propio. **B.** *P. intensa* con tipo III de excípulo propio. **C.** - **D.** *Arctoparmelia centrifuga* con tipo III de excípulo propio. **E.** *Hypogymnia wittata* con tipo II de excípulo propio. **F.** *Brodoa atrofusca* con tipo II de excípulo propio y capa basal de apariencia cortical ancha. **C.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 μm. **A.** - **B.** & **D.** - **F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm.

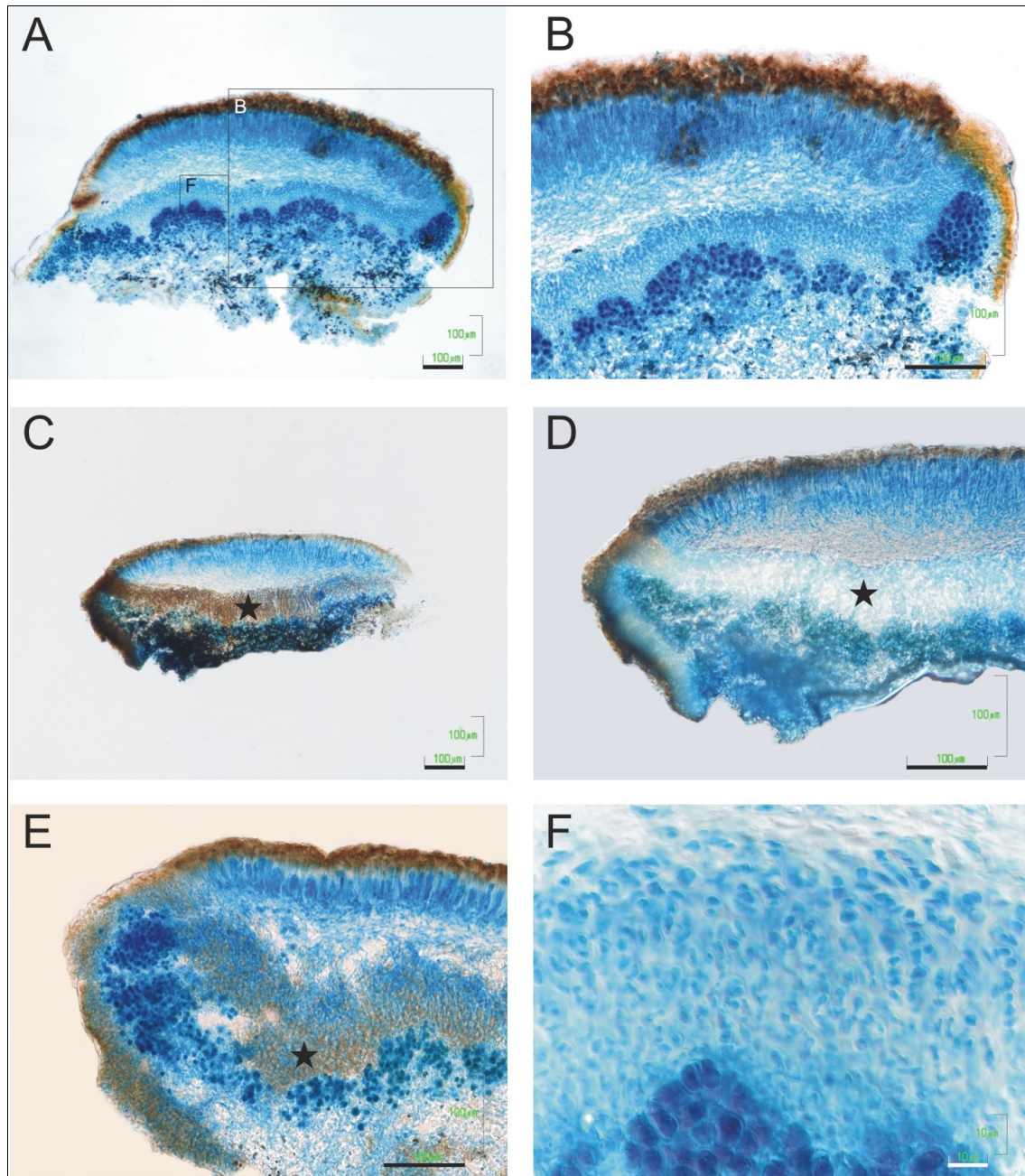


Figura 25 – Género *Protoparmelia*, tipo II del excípulo propio de apotecio parmeliáceo y con una capa hialina excepcionalmente ancha. **A. - B. & F.** *P. nitescens*. **C. - D.** *P. badia*. **E.** *P. rhombosporea*. En **C. - E.** se observa capa basal reluciente (*) por presencia de los extrolitos. **A. - E.** Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Podemos observar la continuación del excípulo propio en excípulo talino. Escala = 100 μm. **F.** Detalle del excípulo propio. Escala = 10 μm.

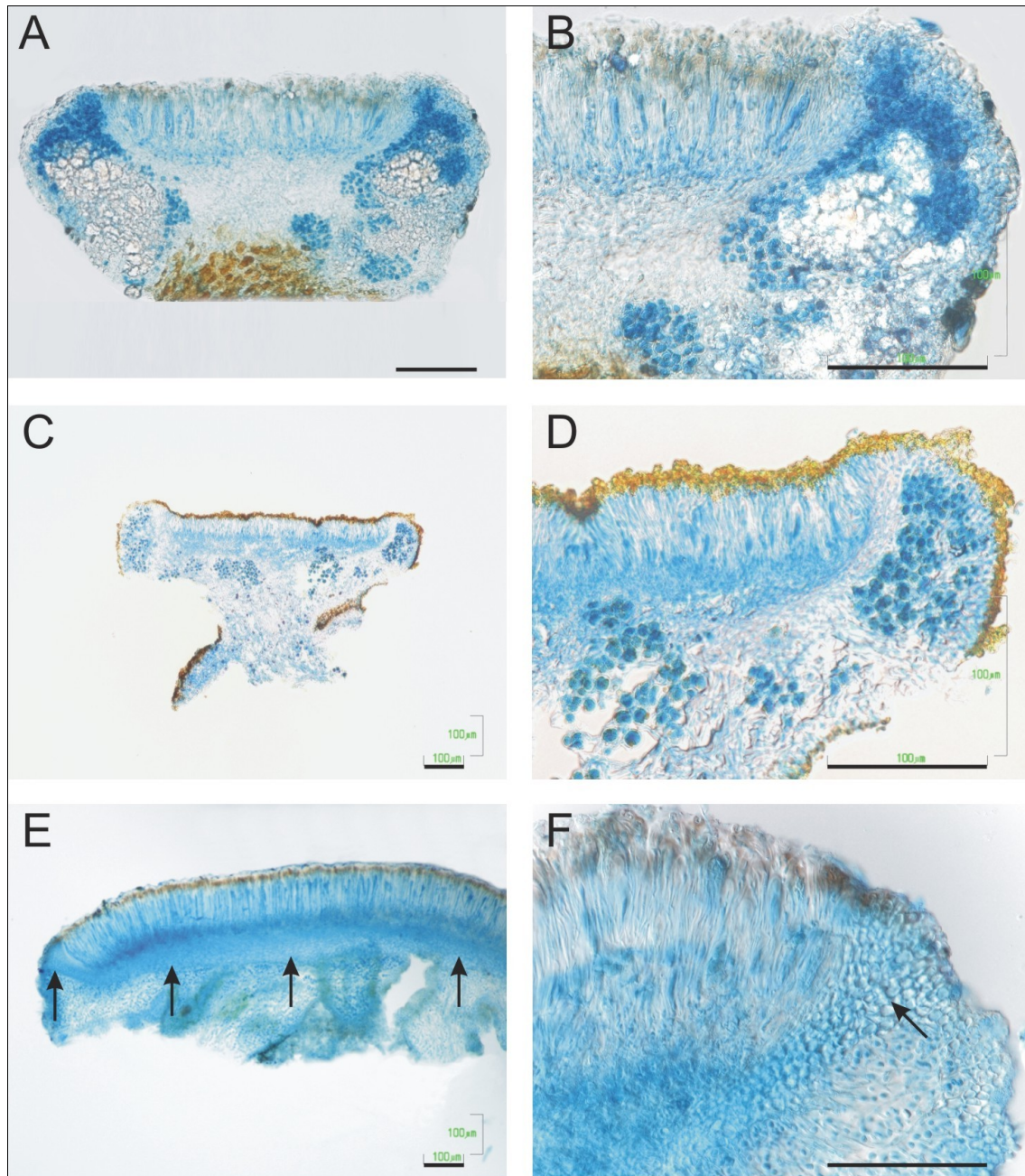


Figura 26 – A. - B. *Lecanora muralis*, apotecio lecanorino. C. - D. *Xanthoria parietina*, apotecio lecanorino. E. - F. *Leptogium lichenoides*, apotecio con excípulo propio en forma de cúpula y con la anatomía parecida al cortex (ver las flechas) A. - F. Corte transversal del apotecio teñido con azul de lactofenol. Escala = 100 µm.

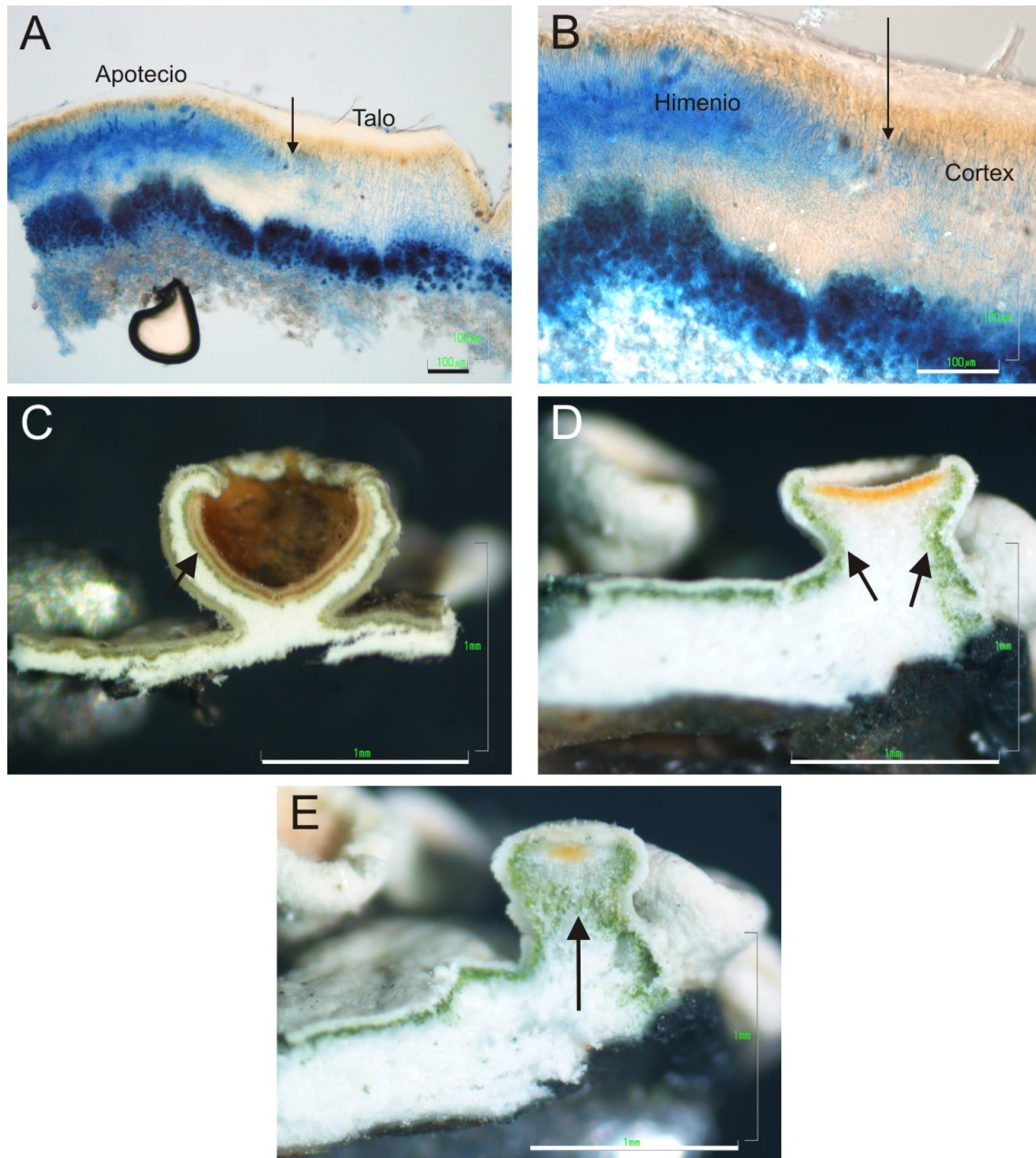


Figura 27 – A. - B. *Gypsoplaca macrophylla*. Corte transversal del talo y del apotecio teñido con azul de lactofenol. La flecha señala la zona de división entre el himenio del apotecio y el cortex del talo. Escala = 100 µm. **C.** *Parmelia adaugescens*. Apotecio cortado por el centro. La flecha señala la estructura del excípulo propio rodeado por una capa algal continua. **D. - E.** *Rhizoplaca chrysoleuca*. **D.** Apotecio cortado por el centro. Las flechas señalan capa algal restringida al excípulo talino y se puede observar, que no se forma un excípulo propio cupulado. **E.** Apotecio cortado por el plano lateral desde centro. Las flechas señalan capa algal rodeando el subhimenio y himenio dando una falsa impresión de existencia de una estructura cupular. Escala = 1 mm.

Corelación entre la anatomía del carácter y la filogenía de la familia

Los cinco tipos de apotecio parmeliáceo se distribuyen a lo largo del árbol filogenético (Crespo *et al.* 2010b) como muestra la Figura 28.

El clado A (clado Parmotrema con los géneros: *Austroparmelina*, *Canoparmelia*, *Crespoa*, *Flavoparmelia*, *Flavopunctelia*, *Parmotrema*, *Punctelia*,) presenta el tipo I, II y III del apotecio parmeliáceo.

El clado B (clado Xanthoparmelia con el género *Xanthoparmelia*) presenta los apotecios parmeliáceos del tipo I y II.

El clado C (clado Cetrelia con el único género *Cetrelia*) no ha podido ser investigado por falta de material fértil. Este género está generalmente considerado como género estéril.

El clado D (clado Parmelina con los géneros: *Bulbothrix*, *Myelochroa*, *Parmelina*, *Parmelinella*, *Remototrachyna*) presenta los tipos I y II y IV entremezclados.

El clado E (clado Hypotrachyna con los géneros *Cetrariastrum*, *Everniastrum*, *Hypotrachyna*, *Parmelinopsis*) presenta los tipos I, II, III y IV entremezclados.

El clado F (clado Parmeliopsis con el único género *Parmeliopsis*) presenta el tipo IV.

El clado G (clado Nipponoparmelia con el único género *Nipponoparmelia*) presenta el tipo II.

El clado H (clado Parmelia) presenta el tipo II y III (géneros *Parmelia* s. str., *Relicina*, *Relicinopsis*) y el tipo V exclusivo de *Notoparmelia* (parmelias australianas). La reducción del excípulo propio en *Notoparmelia* en una capa, se considera como una atrofia secundaria, ya que el género *Notoparmelia* dentro del clado Parmelia forma el grupo hermano de otros géneros con excípulo propio compuesto por tres capas, de tipo II y III. Además, el primordio se origina en la misma zona que en otras especies parmeliáceas, el desarrollo ontogenético sigue los mismos pasos con la única diferencia, que todo el excípulo propio está compuesto por la capa hialina. La capa intermedia y la estructura de apariencia cortical no se forma.

El clado J (clado Melanohalea con los géneros: *Endomelanelia*, *Melanelia*, *Melanelixia*, *Melanohalea*, *Pleurosticta*) presenta el tipo II y III.

Los demás géneros parmeliáceos estudiados, fuera del clado parmelióide, presentan en general el tipo II de apotecio parmeliáceo. Hay dos excepciones, el género *Pseudevernia*, donde se ha observado además del tipo II en *P. furfuracea*, el tipo III en *P. intensa*. Otra excepción es el género *Platismatia* con el tipo V, al que igual que a *Notoparmelia*, podemos atribuir la atrofia.

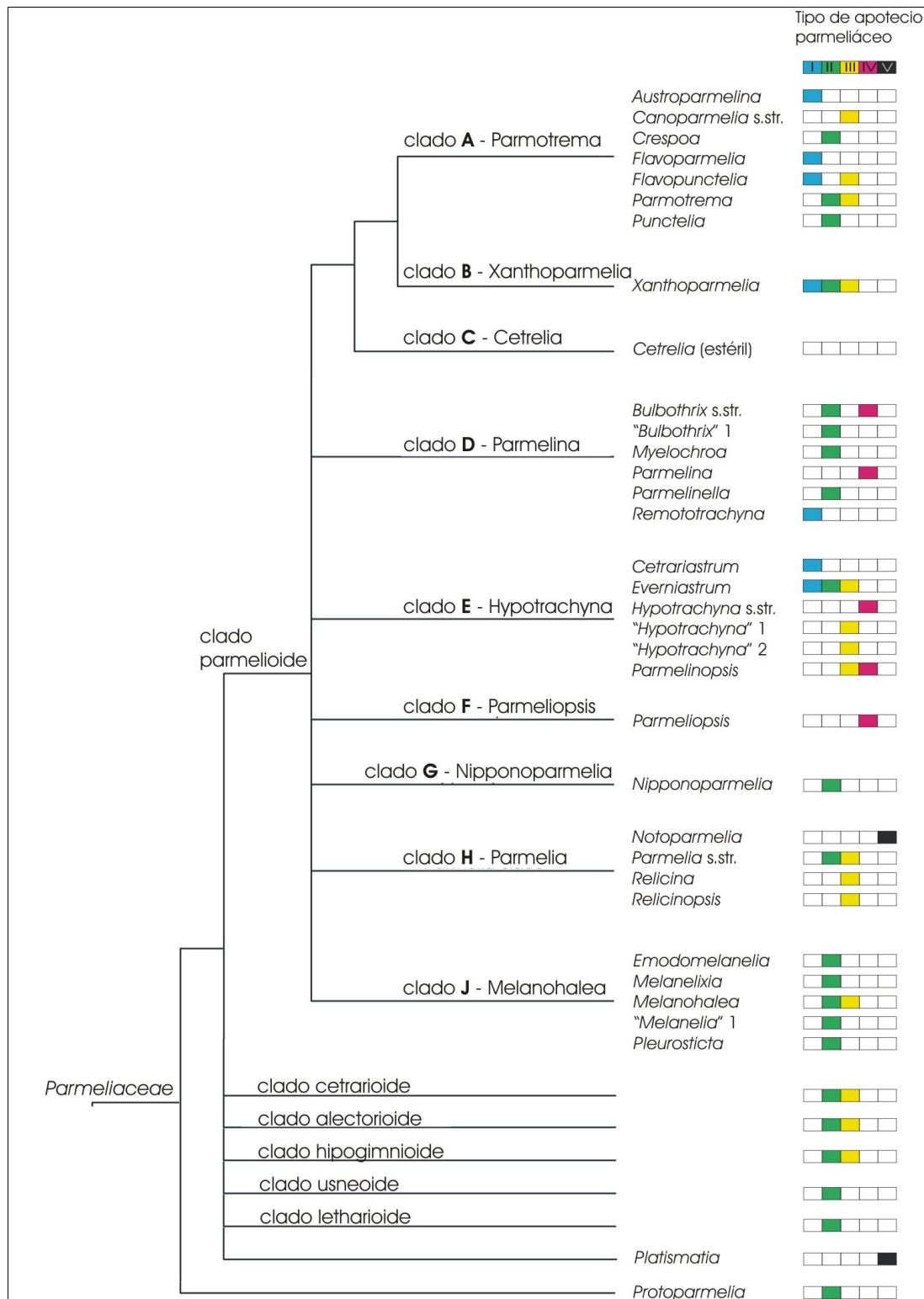


Figura 28 – Distribución de los distintos tipos de apotecio parmeliáceo en el árbol filogenético basado en 3 genes de la familia Parmeliaceae (Crespo et al. 2010b). Los diferentes tipos de apotecio están representados por cuadrados de colores: tipo I - azul, tipo II - verde, tipo III - amarillo, tipo IV - rojo, tipo V - negro.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran, que los apotecios con un excípulo propio compuesto por capa hialina, capa intermedia y una estructura basal de apariencia cortical son típicos de las especies de la familia *Parmeliaceae*. Los parmeliáceos presentan variabilidad en el excípulo propio, pudiendo distinguirse varios tipos en función de las anchuras relativas de las capas por las que esta formado. La orientación de las hifas y la forma de las células que constituyen dichas hifas en la parte basal del excípulo propio es un carácter claramente variable yendo desde hifas verticales casi paralelas, separadas entre sí por mucha matriz y formadas por células alargadas en forma de hueso (tipo I) hasta las hifas muy cercanas y formadas por células casi redondas (tipo IV). La anatomía del excípulo propio es constante a nivel individual y específico, no variando entre distintos cortes del mismo apotecio, ni entre los distintos apotecios del mismo talo, ni siquiera entre talos distintos de la misma especie.

La topología del carácter, con el tipo II presente en todos los clados de los líquenes parmelioides, excepto el clado F (*Parmeliopsis*), así como en los géneros estudiados de los otros clados de la familia *Parmeliaceae* podría indicar, que el tipo II sea el tipo más ancestral y que los otros tipos se han desarrollado varias veces en distintos géneros a lo largo de la historia evolutiva de *Parmeliaceae*.

Así los tipos I y III son unos derivados extendidos del tipo II y los tipos IV y V parecen ser unos derivados puntuales. El tipo IV esta presente solo en los clados D y E. El tipo V esta presente únicamente en el clado H de los líquenes parmelioides, aunque también se ha encontrado puntualmente en el género *Platismatia*.

Los apotecios de todas las demás especies estudiadas, no pertenecientes a la familia *Parmeliaceae*, carecen de un excípulo propio de características previamente mencionadas y cerrado en su base, y además carecen de capa algal (apotecios lecideinos) o esta no forma una capa continua por debajo del subhimenio sino que esta restringida a las partes laterales del apotecio (apotecios lecanorinos, Fig. 2 y 26A-D). Éste carácter se debe observar siempre en el corte transversal mediano del apotecio maduro.

La semejanza de la anatomía de la parte basal del excípulo propio con el tejido cortical de los líquenes parmeliáceos se debe a la posición en la que empieza el desarrollo del apotecio. Como el primordio se origina en la zona inferior del cortex del talo, siempre por encima de la capa algal (Fig. 3A), las hifas que contribuyen a la formación del excípulo propio de estos líquenes son hifas corticales (y no medulares como en el resto de hongos liquenizados). Estas hifas se observan igual que en el tejido cortical como relativamente cortas y bifurcadas. Pero no en todas las especies coincide el tipo del córtex con el tipo del excípulo cortical, siendo con mas matriz extracelular el córtex del talo.

Es interesante, que Schneider (1897) ya en el siglo XIX, en la descripción de los géneros *Parmelia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Evernia*, *Alectoria* y *Bryopogon*, actualmente pertenecientes a la familia *Parmeliaceae* destacó la estructura del hipotecio (en nuestro texto nos referimos a esta estructura como el excípulo propio) como más o menos cortical y compuesta de dos capas bien diferenciadas (incluso de tres en el caso de *Alectoria sarmentosa*). Además destaca la doble capa algal en la estructura del apotecio. Basándose en esta observación propone que cada apotecio podría representar un talo secundario y tal contribuir no solo a la reproducción sino también a la asimilación. Cabe destacar, que ninguno de los autores recientes que trabajaron con la estructura y ontogenia del apotecio parmeliáceo (e.g. Letrouit-Galinou, Henssen, Jahns) se apoyó ni recogió las observaciones de Schneider pero a nosotros nos parece muy importante destacar sus observaciones, porque compartimos la misma hipótesis sobre la estructura cortical del excípulo propio. Smith (1921) destaca el desarrollo de *Parmeliaceae* como un modo de variabilidad de los líquenes con los apotecios, señalando que el origen de los ascogonios no está en la capa medular sino que más cerca de la superficie y que desde el comienzo del desarrollo del apotecio, el primordio está rodeado por un tejido parecido al córtex.

En mayoría de especies observadas, el excípulo propio de los apotecios no se puede distinguir en la observación macroscópica bajo lupa como una estructura autónoma. La única manera de ver su presencia es mediante cortes transversales del apotecio y observación microscópica. En los cortes se aprecia la semejanza de la anatomía de estructura basal del excípulo propio con la anatomía del córtex del excípulo talino, incluso se puede ver como si la primera tuviera una continuación en la segunda (Fig. 6E; 8A, C; 9A, C, F; 10A, C, E; 11A, C; 17C; 18E; 20A; 21A, C; 22A, E; 23C; 25A-E). Esto no ocurre en el caso de género *Parmelina*, donde el excípulo propio esta melanizado en sus partes distales (Crespo *et al.* 2010a) y por lo que se distingue claramente no solo en los cortes (Fig. 13) sino bajo lupa. Una estructura análoga al excípulo propio parmeliáceo se observa en el género *Leptogium* (Fig. 26E, F), donde el excípulo propio esta compuesto por pseudotejido paraplectenquimático, que es de la misma anatomía que el córtex superior del talo.

De especial interés para la comprensión del valor taxonómico de excípulo propio es el caso del género *Protoparmelia*. *Protoparmelia* se considera perteneciente a la familia *Parmeliaceae* precisamente por la estructura y la ontogenia del apotecio (Miyawaki 1991, Henssen 1995) pero su posición en los análisis filogenéticos moleculares es aún dudosa (Arup *et al.* 2007), y tiene sus propias características en la estructura del excípulo propio. Las medidas relativas de las tres capas se diferencian de todas las demás especies, pero por la estructura de la capa basal, que parece ser la más indicativa, lo hemos incluido dentro del tipo II de apotecio parmeliáceo, el tipo más común. La capa hialina es extremadamente ancha comparando con el resto de las especies parmeliáceas. Henssen (1995) concluye lo mismo comparando *Protoparmelia badia* con otras especies de *Parmeliaceae* en sus

trabajos previos (Henssen 1991, 1992 a, b, Henssen & Titze 1992). Ésta capa hialina fuertemente desarrollada ha sido el carácter, que varios autores malinterpretaron como “excípulo propio cupulado”, carácter típico de *Parmeliaceae*, y que sirvió para proponer la inclusión en dicha familia de especies que según nuestros criterios morfológicos y ontológicos no pertenecen a ella, p.ej. *Lecanora opiniconensis* (Lumbsch *et al.* 1991), *Maronina orientalis* (Kantvilas *et al.* 2010, Papong *et al.* 2011), *Lecidea rubrocastanea* (Printzen 2010). Todas estas especies igual que las especies de los géneros *Arctopeltis*, *Rhizoplaca*, *Caloplaca*, *Collema*, *Rinodina*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Ramalinora*, *Maronina* no presentan el excípulo propio de tipo parmeliáceo, sino desarrollan una capa hialina muy ancha. A pesar de que esta capa se ha considerado cómo cupular, no es así: esa interpretación se debe a que muchas observaciones están basadas en cortes transversales no dirigidos por el centro del apotecio. En esos cortes la capa algal puede rodear la capa hialina por debajo dando la impresión de que la capa hialina tiene forma de una estructura cupular (Fig. 27F). Si apotecio hubiera sido cortado directamente por el centro (Fig. 27E), la capa algal dejaría un espacio conectando la capa hialina y la médula, como se puede observar en *Lecanora muralis* (Fig. 26A, B) o *Xanthoria parietina* (Fig. 26C, D).

Nuestras observaciones indican que aunque en muchas descripciones de la estructura de los apotecios en otros géneros, p.ej. *Leptogium* en *Collemataceae*; *Gyalecta* y *Ramonia* en *Gyalectaceae*; *Placopsis*, *Trapelia* y *Trapeliopsis* en *Agyriaceae*) aparece el término “excípulo propio cupulado” (por la forma cupular del excípulo o de la capa hialina), en ninguno de los casos es una estructura homóloga a la de la familia *Parmeliaceae*. La estructura del excípulo propio cupulado parmeliáceo con la capa hialina, capa intermedia y parte basal de apariencia cortical rodeada por capa algal continua es una estructura única y característica de la familia *Parmeliaceae*.

Tal y como resumen Feige & Lumbsch (1998), la capa hialina (refiriendo se a ella como un “hipotecio fuertemente gelatinizado”) no parece tener un gran valor taxonómico porque parece que se ha desarrollado varias veces independientemente en varios grupos taxonómicos. Por el contrario la estructura que es el carácter único de la familia *Parmeliaceae* y está presente en todas las especies de la familia, menos en los géneros *Notoparmelia* y *Platismatia*, es la estructura basal de apariencia cortical (excípulo cupulado meristemático según Henssen 1981; cáscara pseudoparenquimática según Letrouit-Galinou 1970) rodeada por la capa algal.

Arup *et al.* (2007) en la búsqueda del grupo hermano de la familia *Parmeliaceae* utiliza herramientas moleculares y reconstruye un árbol filogenético a base de dos regiones, nuLSU y mtSSU. Establecen un clado soportado, donde se encuentran tres clados con alto soporte pero sin resolución de las relaciones entre ellos. Uno de los clados está formado por los representantes de la familia *Parmeliaceae*, el otro por dos especies de *Protoparmelia* y

el otro por la familia *Gypsoplacaceae* con la única especie, *Gypsoplaca macrophylla*. Ya hemos mencionado, que el género *Protoparmelia* está considerado como perteneciente a la familia *Parmeliaceae* basándose en la morfología y ontogenia del apotecio (Henssen 1995). Presenta unos apotecios, que se desarrollan en la zona del córtex superior y en el estado adulto están protegidos y/o soportados por el excípulo propio con su parte basal de apariencia cortical (Fig. 25). Por el contrario, Timdal (1990) describe los ascocarpos de *Gypsoplaca* como no delimitados por un excípulo sino continuos con el talo. Observamos lo mismo que ella, que las hifas ascógenas crecen dentro del córtex superior y lo transforman en el himenio. La capa algal y médula no se alteran con la transformación del córtex (Fig. 27A, B). Cabe preguntarse, si *Parmeliaceae* (incluyendo *Protoparmelia*) y *Gypsoplaca* no podrían tener un pariente común, en el que surgió el desarrollo de los ascogonios por encima de la capa algal y incluyendo así el córtex, como tejido de protección y soporte para los cuerpos fructíferos, lo que permitió el desarrollo de unos apotecios de gran tamaño en los parmeliáceos. En *Gypsoplaca* el himenio se había quedado integrado en el propio córtex del talo sin ninguna alteración posterior del talo, manteniendo el ascocarpo continuo con el talo, mientras que en los apotecios de *Parmeliaceae* el himenio envuelto por la estructura de apariencia cortical y continua con el cortex, se había elevado con el crecimiento de talo en forma de la copa. Así podríamos explicar el singular desarrollo del excípulo propio con su parte basal de apariencia cortical de los apotecios en *Parmeliaceae*. En *Lecanoraceae*, el desarrollo del apotecio es medular, los ascogonios aparecen en la médula o zona algal, pero siempre por debajo de la capa algal, a la que junto con el cortex están obligadas de romper durante el desarrollo del apotecio, para poder abrirse camino hacia la superficie del talo.

Recientemente, Papong *et al.* (2011) incluyeron las especies del género *Maronina* en el género *Protoparmelia*. Según los criterios morfológicos y ontológicos del apotecio, esta sinonimia ha sido prematura y no está soportada. Aunque en el análisis molecular las especies de *Protoparmelia* y las de *Maronina* forman un clado soportado, no se puede utilizar esto como el único criterio para sinonimizarlas. Primero, porque dentro de este clado hay otros dos clados soportados, uno compuesto por dos especies cortícolas de *Protoparmelia* junto con dos especies de *Maronina* (ninguna de ellas la especie tipo) y el otro formado por las especies saxícolas de grupo *Protoparmelia badia*, que es la especie tipo. Los dos clados no comparten la morfología ni el desarrollo del apotecio. Mientras en el segundo clado, las especies desarrollan el excípulo propio tal como descrito para el género *Protoparmelia* y la familia *Parmeliaceae*, las especies fértiles del primer clado, *Maronina orientalis* y *Protoparmelia capitata*, no lo desarrollan (Fig. 27 C, D). Como este es un carácter típico y común para la familia, no puede aceptarse la sinonimia de *Maronina* con *Protoparmelia*, ni la inclusión del género *Maronina* en la familia *Parmeliaceae*. Igualmente sin un profundo estudio morfológico y molecular de los dos géneros no parece aceptable la

propuesta de considerar *Maronina* como grupo hermano de la familia *Parmeliaceae*. Por aquí debería seguir el siguiente trabajo.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado el potencial taxonómico de la anatomía microscópica del apotecio en los miembros foliáceos de la familia *Parmeliaceae*, especialmente del clado parmeliode. Del trabajo salen siguientes conclusiones:

1. La estructura compleja del apotecio en *Parmeliaceae* con la capa hialina debajo del subhimenio, una capa intermedia y la presencia de una estructura basal de apariencia cortical es única entre los ascomicetes liquenizados (Henssen 1981) y no liquenizados (Letroui-Galinou 1970). Se propone utilizar el término “apotecio parmeliáceo” para referirse al apotecio con estas características.

2. El apotecio en *Parmeliaceae* se origina en la parte basal del córtex superior, siempre por encima de la capa algal.

3. La semejanza de la anatomía de la estructura basal del excípulo propio con el tejido cortical de los líquenes parmeliáceos se debe a la posición en la que empieza el desarrollo del apotecio.

4. Se han descrito cinco tipos del apotecio parmeliáceo.

5. Se ha adjudicado a cada género (menos los géneros estériles) del clado parmeliode uno o varios tipos de anatomía del apotecio.

6. Se ha demostrado que los nuevos caracteres se tienen que investigar y estudiar en detalle y en el máximo número posible de representantes para poder encontrar y definir su significado en taxonomía ya sea a nivel de los clados o géneros.

7. Nuestros resultados indican que la estructura del excípulo propio en *Parmeliaceae* es un carácter importante, constante a nivel individual y específico, no variando entre distintos cortes del mismo apotecio, ni entre los distintos apotecios del mismo talo, ni siquiera entre talos distintos de la misma especie.

8. Se ha encontrado un carácter macroscópico común a todas las especies del género *Parmelina*: los extremos distales del excípulo propio están melanizados.

BIBLIOGRAFIA

- Argüello, A., del Prado, R., Cubas, P. & Crespo, A. 2007. *Parmelina quercina* (Parmeliaceae, Lecanorales) includes four phylogenetically supported morphospecies. *Biological Journal of the Linnean Society* 91(3), 455-467.
- Arup, U., Ekman, S., Grube, M., Mattsson, J.-E. & Wedin, M. 2007. The sister group relation of *Parmeliaceae* (Lecanorales, Ascomycota). *Mycologia* 99(1), 42–49.
- Bellemère, A. & Letrouit-Galinou, M.A. 1988. Asci, ascospores and ascomata. In: *CRC Handbook of lichenology, Volume I*, Galun, M. (Ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Blanco, O., Crespo, A., Elix, J.A., Hawksworth, D.L. & Lumbsch, H.T. 2004. A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* 53(4), 959-975.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P.K., Elix, J.A. & Lumbsch, H.T. 2005. Molecular phylogeny of parmotrema-like lichens (Ascomycota, *Parmeliaceae*). *Mycologia* 97(1), 150-159.
- Crespo, A., Divakar, P.K. & Hawksworth, D.L. 2011. Generic concepts in parmelioid lichens, and the phylogenetic value of characters used in their circumscription. *The Lichenologist* 43(6), 1-25.
- Crespo, A., Lumbsch, H.T., Mattsson, J.-E., Blanco, O., Divakar, P.K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan, P.A. & Wedin, M. 2007. Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 44(2), 812-824.
- Crespo, A., Ferencova, Z., Perez-Ortega, S., Elix, J.A. & Divakar, P.K. 2010a. *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota). *Systematics and Biodiversity* 8(2): 209-221.
- Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P.K., del Prado, R., Perez-Ortega, S., de Paz, G.A., Ferencova, Z., Blanco, O., Roca-Valiente, B., Nunez-Zapata, J., Cubas, P., Argüello, A., Elix, J.A., Esslinger, T.L., Hawksworth, D.L., Millanes, A., Molina, M.C., Wedin, M., Ahti, T., Aptroot, A., Barreno, E., Bungartz, F., Calvelo, S., Candan, M., Cole, M., Ertz, D., Goffinet, B., Lindblom, L., Lücking, R., Lutzoni, F., Mattsson, J.-E., Messuti, M.I., Miadlikowska, J., Piercey-Normore, M., Rico, V.J., Sipman, H.J.M., Schmitt, I., Spribille, T., Thell, A., Thor, G., Upreti, D.K. & Lumbsch, H.T. 2010b. Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59(6), 1735-1753.
- del Prado, R., Ferencova, Z., Armas-Crespo, V., de Paz, G.A., Cubas, P. & Crespo, A. 2007. The arachiform vacuolar body: an overlooked shared character in the

- ascospores of a large monophyletic group within *Parmeliaceae* (*Xanthoparmelia* clade, Lecanorales). *Mycological Research* 111(6), 685-692.
- Divakar, P.K., Blanco, O., Hawksworth, D.L. & Crespo, A. 2005. Molecular phylogenetic studies on the *Parmotrema reticulatum* (syn. *Rimelia reticulata*) complex, including the confirmation of *P. pseudoreticulatum* as a distinct species. *The Lichenologist* 37(1), 55-65.
- Divakar, P.K., Crespo, A., Blanco, O. & Lumbsch, H.T. 2006. Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical *Hypotrachyna* clade of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40(2), 448-458.
- Divakar, P.K., Figueras, G., Hladun, N.L. & Crespo, A. 2010a. Molecular phylogenetic studies reveal an undescribed species within the North American concept of *Melanelixia glabra* (*Parmeliaceae*). *Fungal Diversity* 42(1), 47-55.
- Divakar, P.K., Lumbsch, H.T., Ferencova, Z., del Prado, R. & Crespo, A. 2010b. *Remototrachyna*, a newly recognized tropical lineage of lichens in the *Hypotrachyna* clade (*Parmeliaceae*, Ascomycota), originated in the Indian subcontinent. *American Journal of Botany* 97(4), 579-590.
- Eigler, G. 1969. Studien zur Gliederung der Flechtengattung Lecanora. *Dissertationes Botanicae* 4, 1-195.
- Elix, J.A. 1993. Progress in the generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (Ascomycotina: *Parmeliaceae*) and a synoptic key to the *Parmeliaceae*. *Bryologist* 96(3), 359-383.
- Feige, G.B. & Lumbsch, H.T. 1998. The ascoma development in *Arctopeltis thuleana* (*Lecanoraceae*) and its systematic significance. *Cryptogamie, Bryologie, Lichénologie* 19(2-3), 147-153.
- Hafellner, J. 1984. Studien in Richtung einer natürlicheren Gliederung der Sammelfamilien Lecanoraceae und Lecideaceae. *Beiträge zur Lichenologie. Festschrift J.Poelt. Beiheft zur Nova Hedwigia* 79, 241-371.
- Hafellner, J. 1994. Problems in Lecanorales systematics. *In*: Hawksworth, D.L. (Ed.) *Ascomycete Systematics. Problems and Perspectives in the Nineties*, Plenum Press, New York, pp. 315–320.
- Hafellner, J. & Rogers, R.W. 1994.
- Hale, M.E. 1984. An historical review of the genus concept in lichenology. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 79, 11-23.
- Hale M.E. 1985. *Xanthomaculina* Hale, A new lichen genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *The Lichenologist* 17(3), 255–265.
- Hale, M.E. 1987. A monograph of the lichen genus *Parmelia* Acharius sensu stricto (Ascomycotina: *Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 66, 1-55.

- Hawksworth, D.L. 1988. [Review of:] J. A. Elix, J. Johnston & P. M. Armstrong: A Revision of the Lichen Genus *Xanthoparmelia* in Australasia. Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany 15(3): 163-362. 1986. The Lichenologist 20(3), 302-303.
- Hähndel, J. 1977. Doctoral thesis, University of Marburg, Germany (ex Henssen, A., 1981).
- Henssen, A. 1976. Studies in the developmental morphology of lichenized Ascomycetes. In: Brown, D.H., Hawksworth, D.L., Bailey, R.H. (Eds.), Lichenology: Progress and problems. Academic Press, London and New York, pp. 107-138.
- Henssen, A. (in cooperation with Keuck, G., Renner, B. & Vobis, G.) 1981. The lecanorean centrum. In: Reynolds, D.R. (Ed.), Ascomycete systematics - The Luttrellian concept, Springer-Verlag, Berlin, pp. 138-234.
- Henssen, A. 1991. *Omphalodiella patagonica*, a new peltate lichen genus and species from South America (*Parmeliaceae*). The Lichenologist 23(4), 333-342.
- Henssen, A. 1992a. Thallus morphology and apothecial development in *Omphalodium pisacomense* and *Omphalora arizonica* (*Parmeliaceae*). The Lichenologist 24(1), 27-41.
- Henssen, A. 1992b. *Placoparmelia patagonica*, a new lichen genus and species from Argentina (*Parmeliaceae*). The Lichenologist 24(2), 133-142.
- Henssen, A. 1995. Apothecial structure and development in *Protoparmelia badia* (*Parmeliaceae* s. lat.). In: Daniels, F.J.A., Schulz, M. & Peine, J. (Eds.) Flechten Follmann. Contributions to lichenology in honor of Gerhard Follmann. Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group. Cologne: Botanical Institute, University of Cologne. p. 55-62.
- Henssen, A. & Jahns, H.M. 1974. Lichenes, Eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 467 pp.
- Henssen, A. & Titze, A. 1992. *Neofuscelia squamarina* and *Neofuscelia almbornii* sp.nov. (*Parmeliaceae*). The Lichenologist 24(3), 203-213.
- Jahns, M., Sensen, M. & Ott, S. 1995. Significance of developmental structures in lichens, especially in the genus *Cladonia*. Annales Botanici Fennici 32(1), 35-48.
- Kantvilas, G., Papong, K. & Lumbsch, H.T. 2010. Further observations on the genus *Maronina*, with descriptions of two new taxa from Thailand. The Lichenologist 42(5), 557-561.
- Kärnefelt, I., Mattsson, J.-E. & Thell, A. 1992. Evolution and phylogeny of cetrarioid lichens. Plant Systematics and Evolution 183(1-2), 113-160.
- Kärnefelt, I., Emanuelsson, K. & Thell, A. 1998. Anatomy and systematics of usneoid genera in the *Parmeliaceae*. Nova Hedwigia 67(1-2): 71-92.
- Kauff, F. & Büdel, B. 2005. Ascoma ontogeny and apothecial anatomy in the *Gyalectaceae* (Ostropales, Ascomycota) support the re-establishment of the *Coenogoniaceae*. The Bryologist 108(2), 272-281.

- Kirk, M.P., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (eds.). 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi 10th Ed. CABI Europe-UK, Cromwell Press, Trowbridge. 771 pp. ISBN 978 0 85199 826 8.
- Letrouit-Galinou, M.A. 1968. The apothecia of the Discolichens. The Bryologist 71(4), 297-327.
- Letrouit-Galinou, M.A. 1970. Les Apothécies et les Asques du *Parmelia conspersa* (Discolichen Parméliacée). The Bryologist 73(1), 39-58.
- Letrouit-Galinou, M.A. & Bellemère A. 1989. Ascomatal development in lichens: A review. Cryptogamie, Bryologie, Lichénologie 10(3), 189-233.
- Letrouit-Galinou M.A., Parguey-Leduc, A. & Janex-Favre, M.C. 1994. Ascoma Structure and Ontogenesis in Ascomycete Systematics. In: Hawksworth, D.L. (Ed.) Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties., Plenum Press, New York, pp. 23-36.
- LIAS Glossary. <http://www.lias.net/>
- Lumbsch, T.H. & Huhndorf, S.M. 2010. Outline of Ascomycota – 2009. Myconet 14, 1-42.
- Lumbsch, H.T., Schmitz, K.E. & Feige, G.B. 1991. "*Lecanora*" *opiniconensis*: a placodioid member of the *Parmeliaceae* (lichenized Ascomycotina). Mycotaxon 42, 77-87.
- Miyawaki H. 1991. *Protoparmelia badia* in Japan. Hikobia 11, 29–32.
- Molina, M.C., Crespo, A., Blanco, O., Lumbsch, H.T. & Hawksworth, D.L. 2004. Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia* s. str. (*Parmeliaceae*) inferred from nuclear ITS rDNA and beta-tubulin sequences. The Lichenologist 36(1): 37-54.
- Nash, T.H., III, Hafellner, J & Common, R.S. 1990. *Omphalora*, a new genus in the *Parmeliaceae*. The Lichenologist 22(4), 355-365.
- Núñez-Zapata, J., Divakar, P.K., del Prado, R., Cubas, P., Hawksworth, D.L. & Crespo, A. Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from *Parmelina tiliacea* (Ascomycota: *Parmeliaceae*). The Lichenologist 43(6), 603-616.
- Papong, K., Kantvilas, G. & Lumbsch, H.T. 2011. Morphological and molecular evidence places *Maronina* into synonymy with *Protoparmelia* (Ascomycota: *Lecanorales*). The Lichenologist 43(6), 561-567.
- Poelt, J. & Gärtner, G. 1992. *Gypsoplaca macrophylla*, eine Flechte winterkalter Halbwüsten in den Alpen. Herzogia 9, 229-237.
- Printzen, C. 2010. Lichen Systematics: The role of morphological and molecular data to reconstruct phylogenetic relationships. Progress in Botany 71, 233-275.
- Ryan, B.D., Bungartz, F., Hagedorn, G. & Rambold, G. (eds.) 2005 onwards. LIAS glossary – A Wiki-based Online Dictionary for Ascomycete Terminology used by LIAS, the Global Information System for Lichenized and Non-Lichenized Ascomycetes. <http://glossary.lias.net/>.

- Sincock, C.A. 1982. A preliminary investigation of the taxonomic potential of the excipulum proprium's fine structure in the foliose *Parmeliaceae*. Maser Thesis. University of Reading. United Kingdom.
- Sojo, F., Romeike, J. & Ott, S. 2003. *Himantormia lugubris* (Hue) M. Lamb - vegetative and reproductive habit: adaptations of an Antarctic endemic. *Flora* 198, 118-126.
- Thell, A., Mattsson, J.-E. & Kärnefelt, I. 1995. Lecanoralean ascus types in the lichenized families *Alectoriaceae* and *Parmeliaceae*. *Cryptogamic Botany* 5(2), 120-127.
- Timdal, E. 1990. *Gypsoplacaceae* and *Gypsoplaca*, a new family and genus of squamiform lichens. *Contributions to Lichenology*. In honour of A.Henssen. *Biblioteca Lichenologica* 38, 419-427
- Timdal, E. 1984. The delimitation of *Psora* (*Lecideaceae*) and related genera, with notes on some species. *Nordic Journal of Botany* 4, 525-540.
- Wirtz, N., Printzen, C., Sancho, L.G. & Lumbsch, H.T. 2006. The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (*Parmeliaceae*, Ascomycota) revisited. *Taxon* 55(2), 367-376.

Capítulo II

**Las ascósporas en la familia *Parmeliaceae*:
su valor taxonómico y filogenético**

RESUMEN

La variabilidad de la morfología esporal (forma y dimensiones, contenido interno, ultraestructura de la pared) se ha estudiado en 92 especies, que representan la mayoría de los clados de parmelioides, y en otras 15 especies de parmeliáceos. La ultraestructura de la pared esporal presenta un patrón común: la pared está compuesta de cuatro capas que varían en grosor en distintos grupos. Las variaciones en grosor de la pared, junto con el tamaño y forma de la espora, y el aspecto del vacuoma permiten establecer cinco tipos de esporas. Los principales clados parmelioides no están caracterizados por un único tipo de esporas, ya que presentan gran variabilidad. Sin embargo los caracteres finos de la espora se pueden utilizar como carácter diagnóstico para algunos géneros (por ejemplo *Xanthoparmelia*) o para diferenciar subgrupos dentro de géneros (por ejemplo *Parmelia* s. lat., *Parmelina* s. lat.). Además, se describe por primera vez las distintas etapas de la ascosporogénesis en la familia *Parmeliaceae*.

ABSTRACT

The variability of the spore morphology (shape and dimensions, internal anatomy, ultrastructure of the spore wall) has been studied in 92 species, representing most parmelioid clades, and another fifteen species of *Parmeliaceae*. The ultrastructure of the spore wall has a common pattern, and is composed by four layers which vary in thickness in different groups. The variation in wall thickness together with the size and shape of the spore, and the appearance of vacuoles allows five types of spores to be established. Spore type is highly homoplasious and does not show a clear phylogenetic pattern. Major clades are not characterized by a single type of spore with the exception of the *Xanthoparmelia* clade. Some genera present only one type of spore and their fine features can be used as a diagnostic character (e.g. *Xanthoparmelia*). Some genera are more heterogenous and present different types of spores although, in some cases, they are correlated with phylogenetic subgroups within genera (e.g. *Parmelia* s. lat., *Parmelina* s. lat., *Bulbothrix*). Furthermore, ascosporogenesis is described here for the first time for the *Parmeliaceae*.

INTRODUCCIÓN

Familia Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycota)

Parmeliaceae es una de las mayores y mejor conocidas familias de hongos liquenizados, englobando más de 2000 especies organizadas en 86 géneros (Lumbsch & Huhndorf 2010). Sus representantes son en su mayoría macrolíquenes y presentan distintas formas de crecimiento. Según los estudios moleculares constituye un grupo monofilético bien respaldado (Crespo *et al.* 2007) compuesto por varios linajes monofiléticos que representan diferentes grupos morfológicos - alectorioide, cetrarioide, hipogimnioide, letharioide, parmelioides, psiloparmelioides, usneoide (Crespo *et al.* 2007).

El presente trabajo se centra en el grupo parmelioides, con cerca de 1500 especies (Lumbsch & Huhndorf 2010), que se ha definido con precisión después de contrastarse su carácter monofilético (Crespo *et al.* 2001, Crespo *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b). Actualmente el grupo parmelioides está dividido en nueve clados monofiléticos principales (Crespo *et al.* 2010b), cada uno agrupando uno o más géneros (Fig. 1). La circunscripción genérica ha sido objeto de gran debate en las últimas décadas y evaluada por los análisis moleculares (Blanco *et al.* 2004a, b, 2005; Divakar *et al.* 2006, 2010; Amo *et al.* 2010; Crespo *et al.* 2010b).

La clasificación tradicional de los líquenes parmeliáceos se apoya principalmente en los caracteres vegetativos, p.ej. tipo de córtex superior, estructuras superficiales de intercambio gaseoso, presencia y tipo de cilios y rizinas y/o caracteres químicos, p.ej. tipo de polisacárido presente en las paredes celulares, tipo de extrolitos (= metabolitos secundarios) (p.ej. Hale, 1974, 1984b, 1986a,b, 1988; Elix & Hale, 1987; Elix, 1993; Crespo *et al.* 1999; Divakar & Upreti, 2005). La aceptación de los géneros basados sólo en estos caracteres, sin evaluar los caracteres ascomatales, ha sido controvertida (Poelt & Vezda 1981, Krog & Swinscow 1981, Clauzade & Roux 1986). Los caracteres generativos, tan habitualmente utilizados en la taxonomía de otros hongos, se han empleado comúnmente solo en el caso de los líquenes crustáceos y otros microlíquenes. Sin embargo en los grupos foliáceos se han utilizado con menos frecuencia porque se consideraron bastante uniformes (Hale 1984, Hafellner 1994). En los parmeliáceos han sido aún más infrautilizados especialmente en el caso de los parmelioides, donde un gran porcentaje de las especies descritas solo se conocen estériles o, al menos, el tipo es estéril (Crespo *et al.* 2011).

Ascósporas

Los caracteres de las esporas han recibido poco reconocimiento en los estudios taxonómicos de los líquenes parmelioides, aunque ya Massalongo (1854) utilizó las esporas como un carácter más para establecer los géneros, muchos de ellos aún válidos.

Posteriormente han sido empleados por diversos autores. Ahti (1966) les atribuyó importancia como carácter específico en las especies cortícolas marrones.

Tamaño y forma de la espora se consideraron con mucho valor a nivel genérico en *Parmeliaceae* (Elix 1993, 1994; Divakar & Upreti 2005). Cuanto mas atención se les presta, más evidente resulta que los caracteres de las esporas son tan importantes en esta familia como en otros ascomicetes liquenizados y no liquenizados (Crespo *et al.* 2011). Por ejemplo, las esporas con las paredes gruesas son típicas del género *Parmotrema* (Hale 1965), *Parmelia* (Hale 1987) y las esporas pequeñas con el vacuoma arachiforme está presente en todos los representantes del clado *Xanthoparmelia* (del Prado *et al.* 2007). Destacan los géneros *Sulcaria* y *Anzia*, entre otros, por sus esporas desviantes respecto a las demás *Parmeliaceae* que presentan esporas hialinas.

Hay pocos trabajos en los que se haya utilizado de manera sistemática la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para el estudio de los hongos liquenizados. El estudio taxonómico de *Caliciales* (Tibell 1971, 1975, 1984) y el estudio sistemático de *Physciaceae* (Nordin 1997) son la excepción. También destaca como una de las primeras contribuciones a la ultraestructura de ascomicetes liquenizados el estudio del desarrollo de las esporas de *Physcia aipolia* (Rudolph & Giesy 1966). Se conoce así mismo la ultraestructura de las esporas de algunas especies de *Physcia* y *Physconia* (Moberg 1977), *Physcia stellaris* (Honegger 1978) y algunas especies pluriseptadas de *Buellia* (Nordin 1996).

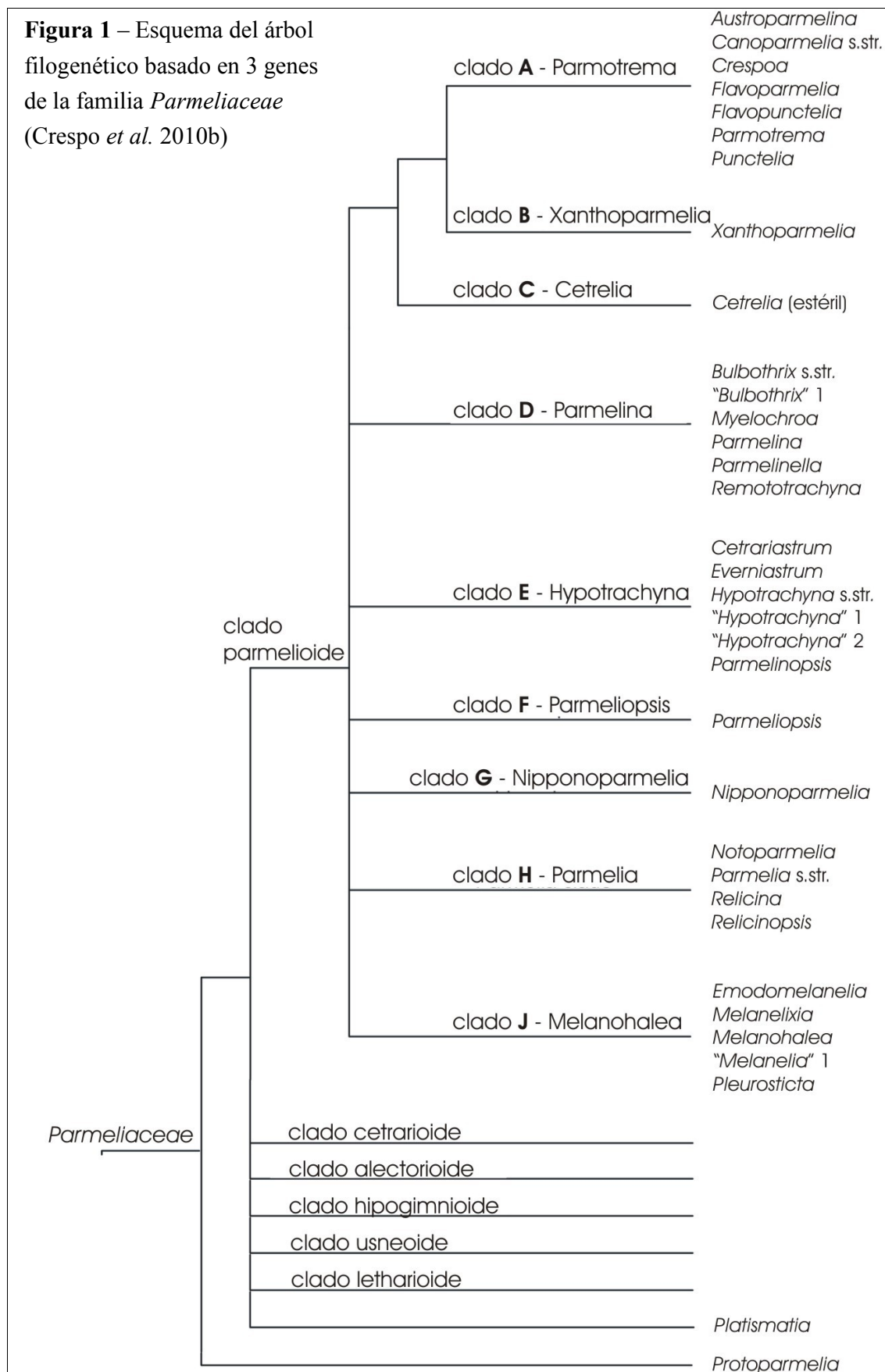
La pared de las esporas maduras está formada por varias capas cuya composición química es poco conocida (Read & Beckett 1996). La terminología que se ha empleado para denominar estas capas es poco consistente, por lo que en este trabajo se utiliza la propuesta de Bellemère (1994), basada en la observación ultraestructural con microscopía electrónica de la pared de ascomicetes no liquenizados, que considera la pared esporal compuesta por tres capas principales: endosporio (la más interna), pared propia y perisporio (la más externa).

El tamaño de la espora depende del número de esporas por asco, de la forma y del tamaño del asco. Como regla general, el tamaño de la espora tiene valor para la identificación a nivel de especie o grupo de especies. Existen incluso algunos géneros, donde el tamaño de la espora varía muy poco (p.ej. *Xanthoparmelia*, *Parmelina*). Hay tendencias como que la reducción del número de esporas esté relacionada con el incremento del tamaño de éstas y eso suele ser específico a nivel de género (p.ej. *Oropogon*, *Sulcaria*).

El número más común de esporas por asco es ocho. En los géneros *Oropogon*, *Sulcaria*, *Menegazzia* se reduce hasta 2.

La mayoría de las esporas son hialinas aunque aquí también encontramos una excepción, p. ej. los género *Anzia* y *Alectoria* con las esporas marrones.

Figura 1 – Esquema del árbol filogenético basado en 3 genes de la familia *Parmeliaceae* (Crespo *et al.* 2010b)



OBJETIVO

El fin de este trabajo es aportar información anatómica y ultraestructural para la discusión de los caracteres esporales en *Parmeliaceae*. Está basado en la observación al microscopio óptico (MO) y microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las esporas en los distintos géneros, mostrando la variabilidad del tamaño esporal y de la pared, concentrándose en los detalles fuera del alcance de microscopio óptico, cómo es la diferenciación de las distintas capas de la pared esporal. Se comparan observaciones hechas con MO y TEM. El objetivo ha sido explorar nuevos caracteres de las esporas, mostrar su rango de variación dentro de la familia *Parmeliaceae* (centrándose en el clado principal parmeliode), y buscar la posible relación de los caracteres esporales con la filogenia molecular (Fig.1). Se incluye la descripción del desarrollo de las esporas parmelioides basado en MO y TEM.

MATERIAL

El material utilizado en este trabajo consiste en muestras de líquenes de herbarios, principalmente del Herbario MAF-Lich, del Departamento de Biología Vegetal II (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid). Se analizaron 92 especies distintas de líquenes parmelioides más otras quince especies parmeliáceas. La información precisa de las muestras está en la Tabla 1 del apartado general "Material".

MÉTODOS

Microscopía óptica (MO)

De cada muestra se separaron del talo tres apotecios maduros. En el caso de material fértil escaso, muestras delicadas o muestras de especie tipo, se utilizó sólo un apotecio por talo. Cada apotecio fue cortado a mano alzada con cuchilla de afeitar, utilizando la lupa binocular (Leica, Wild M8) a 40 aumentos. Los cortes se montaron en agua sobre un portaobjetos, se tiñeron con colorante Azul de lactofenol (Panreac, Barcelona) y se dejaron secar a temperatura ambiente sin calentar. Se hicieron preparaciones permanentes, montadas y selladas para su futura conservación y observación. De cada muestra se eligió una preparación destinada para aplastar, para poder observar y medir las esporas libres, fuera del asco.

Los cortes se observaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Badhoevedrop, Países Bajos), utilizando el método de campo claro y el efecto Nomarski, utilizando de manera sistemática distintos niveles de aumento para la comparación entre

distintas especies y se hicieron las fotos a aumento 1000. Se midieron entre treinta y cincuenta esporas maduras fuera del asco y entre veinte y treinta ascos maduros por espécimen (en distintos cortes y distintos apotecios). Cuando se utilizaron varios ejemplares de la misma especie, se hicieron los cálculos estadísticos conjuntos por especie. Para los análisis estadísticos y la representación gráfica de los resultados se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. Se utilizaron tres tipos de análisis: análisis de regresión simple, análisis de subgrupo y tabulación cruzada.

Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

De los apotecios cortados para la microscopia óptica y en los que se confirmó la presencia de esporas, se tomaron las mitades sobrantes o unos cortes gruesos. Los trozos de apotecios se hidrataron con agua destilada durante 24 horas para conseguir su estado natural. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído (Tousimis, MD, USA) al 2,5 % en tampón fosfato sódico (Na_3PO_4 al 0,1 M, pH = 7,1) durante 6 horas a 4°C. Después se lavaron con el mismo tampón cinco veces y se les aplicó tetróxido de osmio (TAAB Laboratories, Reino Unido) al 1 % durante 2 horas como agente postfijación. Para eliminar el osmio se hicieron 3 lavados con agua destilada. Las muestras se deshidrataron en la serie gradual de acetona (Panreac, España), tres veces durante 15 minutos en cada grado de acetona, siguiendo este orden de concentraciones: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, y seis veces durante 15 minutos en acetona de 100%. Finalmente, los trozos de apotecios se incluyeron en resina Spurr (TAAB Laboratories, Reino Unido) empezando por incluirlos en una mezcla de resina: acetona pura durante 8 - 12 horas en oscuridad en los siguientes gradientes, 1:3; 1:1 y 3:1. Como último paso se incluyeron ya en la resina pura. De los bloques de resina se cortaron cortes semifinos (500 nm) con cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo Ultracut-E Reichert-Jung (Leica Microsystems, Ontario, Canada) que fueron teñidos con azul de toluidina (Panreac, España) y se observaron al microscopio óptico para confirmar la zona de interés (con esporas maduras). Posteriormente se sacaron cortes ultrafinos (50-70 nm) cortando con cuchilla de diamante en el mismo ultramicrotomo y se colocaron en unas rejillas de cobre donde se contrastaron con acetato de uranilo acuoso al 3% durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0,3 % durante 10 minutos para la observación con el microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (JEOL Korea Ltd., Corea del Sur) a 80 kV. De manera sistemática se observaron y fotografiaron a distintos niveles de aumento para la comparación entre distintas especies. Se evaluaron distintos estados del desarrollo esporal para el estudio ontogenético. De las esporas maduras (consideradas como tales por el estado de desarrollo de la pared, ya dividida en capas) y cortadas transversalmente se hicieron medidas aproximadas de las distintas capas.

RESULTADOS

Ascosporogénesis - Desarrollo de las esporas (Figuras 2, 3, 4)

Las esporas se desarrollan dentro de la célula ascal (Fig. 2A, C, E) por compartimentación del citoplasma ascal alrededor de los ocho núcleos originados por una meiosis y una mitosis. Los distintos estados de la ascosporogénesis se definen fácilmente según el desarrollo de la pared de la espora.

1. En la primera fase (Fig. 2B, D, F) se observa la formación de dos membranas alrededor de cada núcleo.

2. En la segunda fase (Fig. 3A, C, E) cada espora está delimitada por una pared primaria, compuesta por el material homogéneo y electrón-transparente depositado entre las dos membranas. El grosor de la pared primaria es casi del 80–90% del grosor final de la pared madura.

3. En la tercera fase (Fig. 3B, D, F) se empieza a formar la pared secundaria, por el depósito de material electrón-denso en la pared primaria y la estructuración en distintas capas.

4. La cuarta fase (Fig. 4) es la de la espora madura, con cuatro capas bien diferenciadas. La capa interior, endosporio ("1"), seguida por la pared propia ("2") y envuelta por el perisporio ("3 y 4") formado por dos capas diferentes.

Ultraestructura de la pared de las esporas

La pared de las esporas maduras parmelioides está compuesta por tres envolturas:

1. Endosporio ("1" en Fig. 4E, F), la envoltura interna. En las especies, donde está bien desarrollada, se presenta como una capa de color gris oscuro. Esta capa es la última en formarse. En general representa 20 - 25 % del grosor de la pared esporal. En algunas especies es muy difícil diferenciarla de la pared propia.

2. Pared propia ("2" en Fig. 4E, F), la envoltura intermedia. En las imágenes aparece de color gris claro, teniendo el grosor aproximado 100 – 200 nm. Su grosor es constante, independientemente del grosor de la pared de la espora. Es la primera capa en formarse y corresponde a la pared primaria.

3. Perisporio ("3 y 4" en Fig. 4E, F), la envoltura externa, formada por dos capas bien diferenciadas. La capa interna ("3" en Fig. 4E, F) que rodea la pared propia, se presenta en las imágenes del TEM como una capa oscura, negra, compuesta por material electrón-denso. Se forma por depósito de material electrón-denso desde el exterior. La capa externa del perisporio ("4" en Fig. 4E, F) se presenta en las imágenes del TEM como una capa muy clara, blanca, compuesta por material electrón-transparente, formando un halo en las imágenes del microscopio óptico. En algunas especies aparece como ondulada. El perisporio es la envoltura más variable.

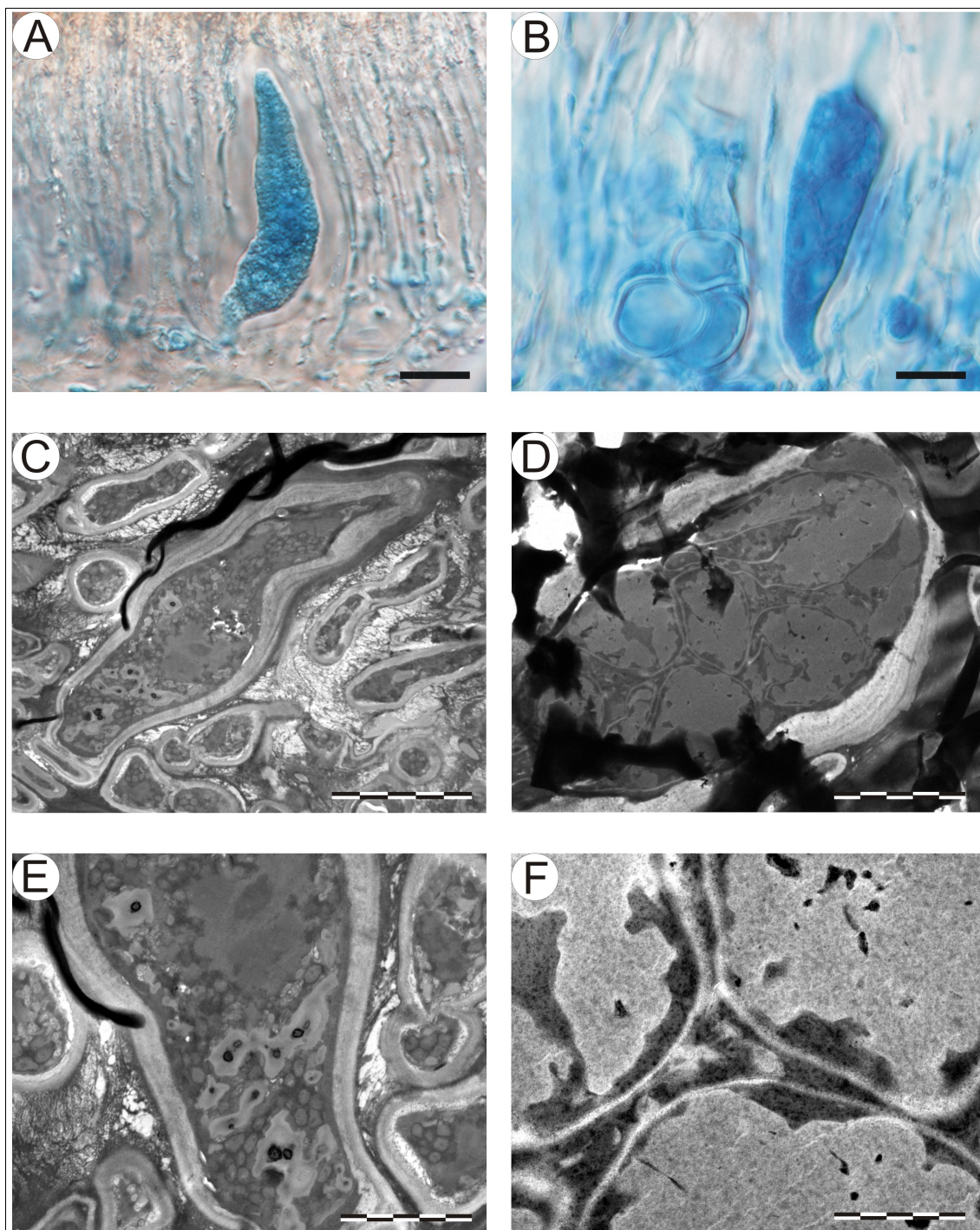


Figura 2 – Desarrollo de las esporas. **A.**, **C.**, **E.** Célula ascal. **A.** *Notoparmelia crambidiocarpa*, escala = 10 µm. **C.** *Xanthoparmelia conspersa*, escala = 8 µm. **E.** *X. conspersa*, escala = 3 µm. **B.**, **D.**, **F.** Primera fase del desarrollo de las esporas por la compartimentación del citoplasma ascal. Formación de las membranas. **B.** *Melanelixia calva*, escala = 10 µm. **D.** *Parmelinopsis subfatiscens*, escala = 5 µm. **F.** *P. subfatiscens*, escala = 1 µm.

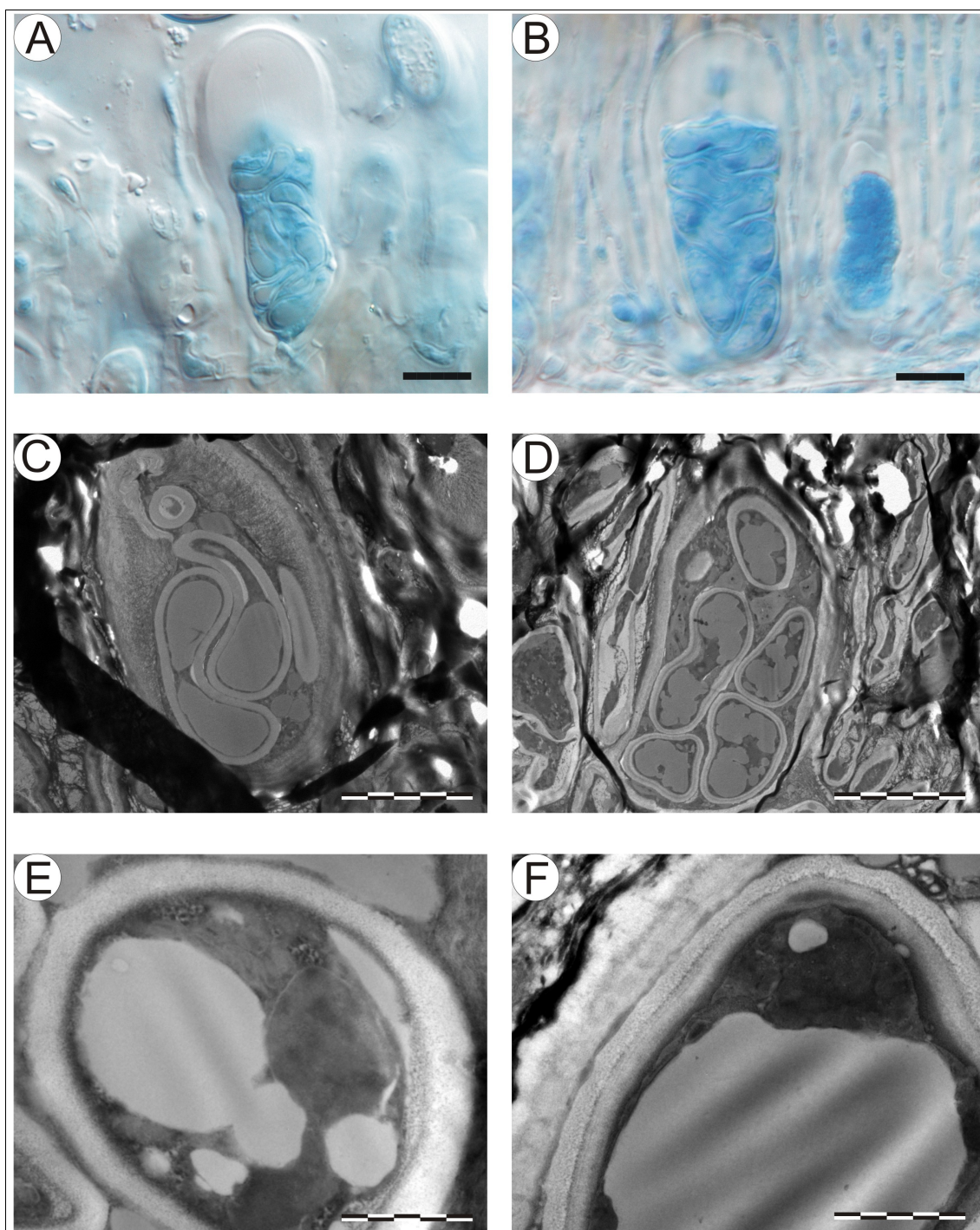


Figura 3 – Desarrollo de las esporas, continuación. **A., C., E.** Segunda fase del desarrollo de las esporas. Formación de la pared primaria. **A.** *Parmotrema nilgherrense*, escala = 10 μm . **C.** *P. nilgherrense*, escala = 8 μm . **E.** *Everniastrum rhizodendroidum*, escala = 1 μm . **B., D., F.** Tercera fase del desarrollo de las esporas. Formación de la pared secundaria. **B.** *Melanelixia calva*, escala = 10 μm . **B.** *M. glabra*, escala = 8 μm . **F.** *Bulbothrix klementii*, escala = 1 μm .

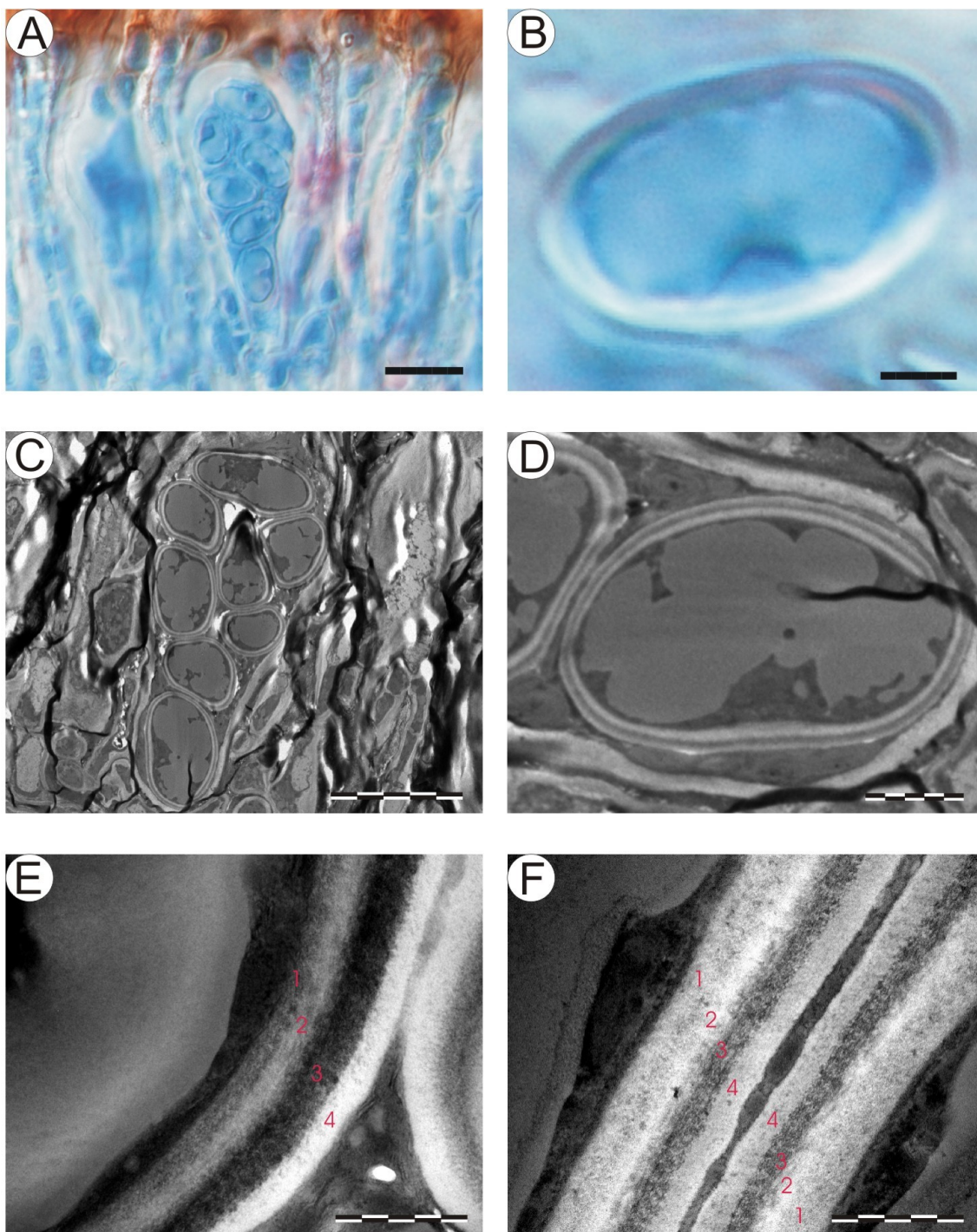


Figura 4 – Desarrollo de las esporas, continuación. **A., C.** Asco con ocho esporas maduras. **B., D.** Espora madura. **E.** Detalle de la pared de una espora madura. **F.** Detalle de las paredes de dos esporas maduras. Capas: 1 - endosporio, 2 - pared propia, 3 - capa interna del perisporio, 4 - capa externa del perisporio. **A.** *Melanelia tomini*, escala = 10 μm . **B.** *M. tomini*, escala = 2 μm . **C.** *Melanelixia glabra*, escala = 10 μm . **D.** *M. glabra*, escala = 2 μm . **E.** *Melanelia panniformis*, escala = 0,5 μm . **F.** *Melanelixia glabra*, escala = 0,5 μm .

Variabilidad morfológica de las esporas en parmelioides

Todas las esporas del clado parmeliode de la familia *Parmeliaceae* son unicelulares y hialinas. Entre distintas especies varían en tamaño (longitud: 7,0-30,0 μm y anchura 4,5-20,0 μm), forma (suglobosa con $L/A = 1,05-1,30$; anchamente elipsoidal con $L/A =$; elipsoidal con $L/A = 1,55-1,86$; estrechamente elipsoidal con $L/A = 1,87-2,14$; alargada con $L/A = 2,15-2,50$), grosor de la pared (400 – 3000 nm), aspecto del vacuoma (elíptico, reniforme, arachiforme, heterogéneo).

Se encontraron relaciones lineares significativas entre la longitud y la anchura de la espora (Fig. 5A), entre la anchura de la espora y la anchura del asco (Fig. 5B), entre la longitud de la espora y la anchura del asco (Fig. 5C), y entre la longitud del asco y la anchura del asco (Fig. 5D). La distribución del tipo de vacuoma (según su aspecto) y la forma de la espora (según el coeficiente L/A) en los distintos clados está representada en la Fig. 5E, F. La distribución de los tipos de esporas según los clados está representada en las Fig. 6 y 7.

A continuación se describe la variabilidad de cada uno de los géneros y/o grupos monofiléticos estudiados en el orden en que aparecen en el árbol filogenético (Fig. 1). Se indica el número de especies de cada género, el número de especies estudiadas por microscopia óptica (MO) y microscopia electrónica de transmisión (TEM). Se describe el tamaño de las esporas, su forma, basándose en la relación entre la longitud y anchura de la espora (L/A), el grosor de la pared y la forma del vacuoma. En el caso de especies estudiadas por TEM, se detalla la variabilidad encontrada en el grosor de las distintas capas de la pared esporal.

Género *Parmotrema* (Fig. 8A, B y 14A-D)

De las 350 especies se han estudiado seis (*P. abessinicum*, *P. cetratum*, *P. hababianum*, *P. nilgherense*, *P. praesorediosum*, *P. thompsonii*) con MO y dos (*P. cetratum*, *P. nilgherense*) con el TEM. Las esporas de todas las especies (menos *P. thompsonii*) son de tamaño grande (15,0-21,0 μm x 8,5-12,5 μm), con pared de grosor ancho y muy ancho (1200-1800 nm) y con vacuoma heterogéneo, formado por muchos vacuomas diminutos. La relación entre la longitud y anchura (L/A) de la espora va de 1,70 hasta 1,83, dando esporas de forma elipsoidal. La ultraestructura de la pared presenta tres capas, cada una de un tercio del grosor total de la pared. El endosporio no se diferencia de la pared propia y entre ambas capas tienen un grosor de 400-450 nm. El perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 350-400 nm.

Parmotrema thompsonii tiene esporas muy grandes (29,0-33,5 μm x 15,5-17,0 μm) con pared extremadamente ancha (2800-3500 nm) y vacuoma heterogéneo. Las esporas son estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,92$).

Género *Crespoa* (Fig. 8D, E)

De las cuatro especies se han estudiado dos (*C. inhaminensis*, *C. schelpei*) con MO. Las esporas son medianas (10,5-13,5 μm x 5,0-7,5 μm), estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,94 - 2,05$), con pared mediana (600-900 nm) y vacuoma elipsoidal.

Género *Flavoparmelia* (Fig. 8F-K y 14E, F)

De las 35 especies se han estudiado seis (*F. caperata*, *F. diffractica*, *F. ferax*, *F. rutidota*, *F. secalonica*, *F. virensica*) con MO y una (*F. caperata*) con el TEM. Las esporas son medianas y grandes (13,0-19,5 μm x 7,0-9,0 μm), elipsoidales, estrechamente elipsoidales hasta alargadas ($L/A = 1,80 - 2,29$), con la pared mediana hasta ancha (600-1000 nm) y con el vacuoma homogéneo elipsoidal o reniforme. La ultraestructura de la pared presenta tres capas, cada una aproximadamente de un tercio del grosor total de la pared. El endosporio no se diferencia de la pared propia y entre ambas capas miden 250-300 nm de grosor. El perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 300-350 nm.

Género *Austroparmelia* (Fig. 8L-Q y 15A-D)

De las siete especies se han estudiado seis (*A. elixia*, *A. endoleuca*, *A. macrospora*, *A. norpruinata*, *A. pruinata* y *A. pseudorelicina*) con MO y dos (*A. pseudorelicina* y *A. elixia*) con el TEM. Todas las especies (menos *A. macrospora*) tienen esporas medianas (9,5-12,5 μm x 6,0-8,0 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,46 - 1,70$), con pared fina hasta mediana (500-800 nm) y vacuoma homogéneo elipsoidal. Las cuatro capas de la pared se diferencian claramente y son de grosor semejante. El endosporio es de 150-180 nm, la pared propia de 150-180 nm y el perisporio compuesto de dos capas, cada una de unos 150-200 nm.

Austroparmelia macrospora tiene esporas grandes (15,5-18,0 μm x 4,5-5,5 μm), muy alargadas ($L/A = 3,44$), con la pared fina (400-500 nm) y vacuoma reniforme.

Género *Punctelia* (Fig. 9A-C y 15E, F)

De las 34 especies se han estudiado cuatro (*P. hypoleucites*, *P. macrospora*, *P. semansiana*, *P. subflava*) con MO y una (*P. hypoleucites*) con el TEM. Las esporas son medianas (10,0-15,0 μm x 6,0-8,5 μm), elipsoidales hasta estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,54 - 2,04$), con pared fina hasta mediana (400-800 nm) y vacuoma elipsoidal o

heterogéneo. La ultraestructura de la pared muestra las cuatro capas diferenciadas. El endosporio es de unos 70-100 nm, la pared propia de 70-100 nm, y el perisporio está compuesto de dos capas: la interna electrón-densa de unos 150-180 nm y la externa electrón-transparente muy fina de unos 50-70 nm.

Género *Flavopunctelia* (Fig. 9D)

De las siete especies se ha estudiado una (*F. darrowii*) con MO. Las esporas son medianas (12,5-14,5 μm x 7,5-8,5 μm), elipsoidales ($L/A = 1,72$), con pared fina (400 nm) y vacuoma heterogéneo.

Género *Canoparmelia* s. str. (Fig. 8C)

De las cuarenta especies se ha estudiado una (*C. texana*) con MO. Las esporas son medianas (9,5-11,0 μm x 6,0-7,5 μm), anchamente elipsoidales ($L/A = 1,47$), con pared mediana (600 nm) y vacuoma elipsoidal.

Género *Xanthoparmelia* (Fig. 10A-I y 16)

De las más de 800 especies se han estudiado diez (*X. almbornii*, *X. angustiphylla*, *X. conspersa*, *X. delisei*, *X. litophilla*, *X. mexicana*, *X. michauxiana*, *X. protomatrae*, *X. pulla*, *X. subincerta*) con MO y cinco (*X. angustiphylla*, *X. conspersa*, *X. litophilla*, *X. mexicana*, *X. subincerta*) con el TEM. Las esporas son pequeñas (7,0-10,0 μm x 4,0-6,0 μm), elipsoidales o estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,55 - 1,76$ y hasta 2,11 en *X. conspersa*), con pared fina (400-500 nm) y vacuoma arachiforme. La ultraestructura de la pared muestra cuatro capas, el endosporio de unos 70-150 nm, la pared propia de 150-250 nm, y el perisporio compuesto de dos capas, cada una de unos 100-120 nm.

Género *Remototrachyna* (Fig. 11A-E y 17E, F)

De las quince especies se han estudiado cinco (*R. adducta*, *R. flexilis*, *R. incognita*, *R. kingii*, *R. scytophylla*) con MO y dos (*R. adducta*, *R. flexilis*) con el TEM. Las esporas son: 1) medianas (10,5-12,5 μm x 4,5-7,5 μm), elipsoidales hasta estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,62 - 1,91$) incluso alargadas ($L/A = 2,32$) en *R. kingii*. La pared es de grosor fino (400-500 nm) y el vacuoma elipsoidal; y 2) grandes (16,0-21,0 μm x 10,0-12,5 μm), elipsoidales ($L/A = 1,55 - 1,66$), con pared mediana (600-800 nm) o ancha (1500-1700 nm) y vacuoma heterogéneo. La ultraestructura de la pared presenta claramente las cuatro capas. En *R. flexilis*, el endosporio es de 100 nm y la pared propia de 150 nm. El perisporio compuesto de dos capas, la interna de unos 250 nm y la externa de unos 70-100 nm. En *R. adducta*, tanto el endosporio como la pared propia son muy anchos, de unos 450-500 nm

cada uno. El perisporio esta compuesto por dos capas, de unos 250-300 nm de grosor cada una.

Género *Bulbothrix* s.str. (Fig. 11I, J y 17A-D)

De las quince especies se han estudiado dos (*B. coronata*, *B. klementii*) con el MO y el TEM. Las esporas son pequeñas (7,0-8,0 μm x 4,5-5,0 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,53 - 1,61$), con pared fina (400 - 500 nm) y vacuoma elipsoidal o reniforme homogéneo. La ultraestructura de la pared muestra claramente las cuatro capas. El endosporio y la pared propia son de unos 100-150 nm cada uno. El perisporio está compuesto de dos capas, la interna de unos 70-100 nm y la externa de unos 100-150 nm.

Grupo monofilético formado por el grupo “*Bulbothrix*” 1 (Fig. 11F, G) y el género *Parmelinella* (Fig. 11H)

De las quince especies del grupo “*Bulbothrix*” 1 se han estudiado dos (“*B.*” *meizospora*, “*B.*” *setschwanensis*) con MO. Las esporas son medianas (13,0-15,0 μm x 7,0-9,0 μm), elipsoidales ($L/A = 1,71 - 1,83$), con pared fina (500-600 nm), y vacuoma elipsoidal o heterogéneo.

De las cuatro especies del género *Parmelinella* se ha estudiado la especie tipo (*P. wallichiana*) con MO. Las esporas son medianas (13,0-15,5 μm x 7,5-10,0 μm), elipsoidales ($L/A = 1,62$), con pared mediana (600-800 nm) y vacuoma heterogéneo.

Género *Parmelina* (Fig. 11M-P y 18A-D)

De las seis especies se han estudiado cinco (*P. atricha*, *P. carporrhizans*, *P. coleae*, *P. quercina*, *P. tiliacea*) con MO y dos (*P. carporrhizans*, *P. quercina*) con el TEM. Las esporas son pequeñas (6,5-9,5 μm x 4,0-6,0 μm), elipsoidales ($L/A = 1,59 - 1,68$), con la pared fina (400-500 nm) y el vacuoma elipsoidal o reniforme. La ultraestructura de la pared presenta tres capas. El endosporio no se diferencia de la pared propia y entre ambas forman una capa de 300-350 nm de grosor. El perisporio está compuesto de capa interna electrón-densa de 100-120 nm y externa electrón-transparente y muy fina, de 70-100 nm.

Género *Myelochroa* (Fig. 11K, L y 18E, F)

De las quince especies se han estudiado tres (*M. aurulenta*, *M. galbinia*, *M. irrugans*) con MO y dos (*M. galbinia*, *M. irrugans*) con el TEM. Las esporas son medianas (12,0-15,5 μm x 7,5-9,5 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,52 - 1,57$), con la pared mediana (700-800 nm) y el vacuoma elipsoidal. La ultraestructura de la pared presenta claramente las cuatro capas. El endosporio de 120-150 nm, la pared propia de 250

nm y el perisporio compuesto de dos capas, la interna de 150-250 nm y la externa de unos 100-120 nm.

Grupo monofilético formado por el género *Parmelinopsis* (Fig. 9E y 19A,B,F) y el grupo “*Hypotrachyna*” 1 (Fig. 9F y 19C, D)

De las veinticinco especies del género *Parmelinopsis* se han estudiado tres (*P. horrescens*, *P. neodamaziana*, *P. subfatiszens*) con MO y dos (*P. horrescens*, *P. subfatiszens*) con el TEM. Las esporas son medianas hasta grandes (12,0-19,5 µm x 7,5-12,0 µm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,49 - 1,66$), con la pared mediana hasta ancha (800-1200 nm) y con el vacuoma heterogéneo. En la ultraestructura de la pared se observan cuatro capas. El endosporio de unos 150-250 nm y la pared propia de 200-300 nm. El perisporio está compuesto por dos capas, cada una de unos 250-300 nm.

De las tres especies del grupo “*Hypotrachyna*” 1 se ha estudiado una (“*H.*” *revoluta*) con MO y TEM. Las esporas son medianas (11,5-13,5 µm x 8,0-9,0 µm), anchamente elipsoidales ($L/A = 1,47$), con la pared fina (500 nm) y con el vacuoma heterogéneo. La ultraestructura de la pared muestra cuatro capas. El endosporio es de 70-100 nm y la pared propia de 100-150 nm. El perisporio está compuesto de dos capas, la interna electrón-densa de unos 100-250 nm y la externa electrón-transparente de unos 70-100 nm.

Género *Hypotrachyna* s.str. (Fig. 9G)

De las 156 especies se ha estudiado una (*H. osseoalba*) con MO. Las esporas son pequeñas (7,5-9,0 µm x 4,0-5,0 µm), elipsoidales ($L/A = 1,84$), con pared fina (450 nm) y vacuoma elipsoidal o reniforme.

Grupo “*Hypotrachyna*” 2 (Fig. 9H-J y 19E)

De las quince especies se han estudiado tres (“*H.*” *fissicarpa*, “*H.*” *physcioides*, “*H.*” *reducens*) con MO y una (“*H.*” *reducens*) con el TEM. Las esporas varían desde pequeñas hasta medianas (9,0-12,0 µm x 4,5-8,0 µm), son anchamente elipsoidales hasta estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,52 - 1,96$), con pared fina (500 nm) o mediana (800 nm para *H. reducens*) y vacuoma elipsoidal, reniforme o heterogéneo. La ultraestructura de la pared de *H. reducens* presenta cuatro capas. El endosporio es de 150-200 nm y la pared propia de 150-200 nm. El perisporio compuesto de dos capas, la interna electrón-densa de unos 200-250 nm y la externa electrón-transparente de unos 100-150 nm.

Género polifilético *Everniastrum* (Fig. 9K, L y 20A, B)

De las cuarenta especies se han estudiado tres (*E. cirrhatum*, *E. lipidiferum*, *E. rhizodendroideum*) con MO y una (*E. rhizodendroideum*) con el TEM. Las esporas de *E. cirrhatum* y *E. lipidiferum* son medianas hasta grandes (13,5-16,5 μm x 8,0-9,5 μm), elipsoidales ($L/A = 1,72 - 1,73$), con la pared mediana (600-700 nm) hasta ancha (1000 nm) en *E. cirrhatum*, y el vacuoma homogéneo o heterogéneo.

Everniastrum rhizodendroideum (Fig. 9K) tiene las esporas muy grande (22,5-24,5 μm x 10,0-11,5 μm), alargadas ($L/A = 2,20$), con pared mediana (600-700 nm) y vacuoma heterogéneo. La ultraestructura de la pared muestra cuatro capas. El endosporio es de unos 100-120 nm y la pared propia de 150-180 nm. El perisporio está compuesto de dos capas, la interna electrón-densa de 220-280 nm y la externa electrón-transparente de unos 70-100 nm.

Género *Cetrariastrum* (Fig. 9M, N y 20C, D)

De las cuatro especies se han estudiado dos (*C. andense*, *C. ecuadoriense*) con MO y una (*C. ecuadoriense*) con el TEM. Las esporas son pequeñas (6,5-7,5 μm x 4,5-5,5 μm), anchamente elipsoidales ($L/A = 1,28$ y 1,49), con pared fina (350-400 nm) y vacuoma elipsoidal. En la ultraestructura de la pared se observan tres capas. El endosporio no se diferencia de la pared propia y las dos capas juntas miden 150-180 nm. El perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 70-100 nm.

Género *Parmeliopsis* (Fig. 12Q y 20E)

De las seis especies se han estudiado dos (*P. ambigua*, *P. hyperopta*) con MO y una (*P. ambigua*) con el TEM. Las esporas son medianas (13,5-14,5 μm x 8,5-9,0 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,50-1,59$), con pared mediana (700-800 nm) y vacuoma elipsoidal. La ultraestructura de la pared presenta tres capas. El endosporio es de 200-250 nm, la pared propia de 150-180 nm y el perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 150-200 nm.

Género *Nipponoparmelia* (Fig. 12O, P y 21E, F)

De las cuatro especies se han estudiado dos (*N. laevior*, *N. ricasolioides*) con MO y una (*N. laevior*) con el TEM. Las esporas son grandes hasta muy grandes (17,0-20,5 μm x 7,5-13,0 μm), con pared mediana (600-800 nm) y vacuoma heterogéneo. Son elipsoidales en *N. ricasolioides* ($L/A = 1,61$) y alargadas en *N. laevior* ($L/A = 2,12$). En la ultraestructura de la pared se observan claramente las cuatro capas, cada una de una cuarta parte del grosor total de la pared. El endosporio es de 150 nm, la pared propia de 150 nm y el perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 120-180 nm.

Género *Notoparmelia* (Fig. 12G-K y 21A-D)

De las trece especies se han estudiado cinco (*N. crambidiocarpa*, *N. erumpens*, *N. tenuirima*, *N. signifera*, *N. subtestacea*) con MO y dos (*N. crambidiocarpa*, *N. signifera*) con el TEM. Todas las especies (menos *N. crambidiocarpa*) tienen las esporas medianas (11,5-15,5 μm x 7,5-10,0 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,48 - 1,83$), con pared fina hasta mediana (400-700 nm) y vacuoma heterogéneo. En la pared se observan las cuatro capas. En *N. signifera*, el endosporio igual que la pared propia tienen unos 200 nm de grosor. El perisporio presenta dos capas, cada una de unos 150-180 nm.

Notoparmelia crambidiocarpa (Fig. 12G) tiene las esporas grandes (17,0-18,0 μm x 11,0-12,0 μm), elipsoidales ($L/A = 1,56$), pared ancha (1000-1200 nm) y vacuoma heterogéneo. La ultraestructura de la pared muestra las cuatro capas. El endosporio es de 250-300 nm y la pared propia de 150-200 nm. El perisporio está compuesto de capa interna electrón-densa de unos 300-350 nm, y capa externa electrón-transparente de unos 120-150 nm.

Género *Parmelia s.str.* (Fig. 12A-F y 22)

De las treinta especies se han estudiado siete (*P. adaugescens*, *P. cochleata*, *P. fertilis*, *P. omphalodes*, *P. saxatilis*, *P. serrana*, *P. sulcata*) con MO y cuatro (*P. adaugescens*, *P. cochleata*, *P. omphalodes*, *P. saxatilis*) con el TEM. Todas las especies (menos *P. adaugescens*) tienen las esporas medianas hasta grandes (12,0-15,5 μm x 6,5-10,5 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales ($L/A = 1,38 - 1,86$), con pared ancha (1000-1500 nm) y vacuoma elipsoidal o heterogéneo. En la ultraestructura de la pared se observan claramente las cuatro capas. En *P. cochleata*, el endosporio es de 200 nm y la pared propia de 200-250 nm. El perisporio presenta capa interna electrón-densa de unos 200-250 nm y capa externa electrón-transparente de unos 150-180 nm. En *P. saxatilis*, el endosporio tiene de 200-250 nm, la pared propia 120-150 nm y el perisporio extremadamente ancho está compuesto por capa interna electrón-densa de unos 200-250 nm y capa externa muy ancha de 700-850 nm. En *P. omphalodes* todas las esporas observadas eran inmaduras, con la pared no diferenciada del todo en las capas (cf. Fig. 22E-F).

Parmelia adaugescens (Fig. 12A) tiene esporas muy grandes (21,0-23,5 μm x 11,5-15,5 μm), elipsoidales ($L/A = 1,80$), con pared muy ancha (2500-3500 nm) y vacuoma heterogéneo. Todas las esporas observadas con el TEM tenían la pared esporal en el estadio primario no diferenciada en capas.

Grupo monofilético formado por los géneros *Relicina* (Fig. 12L) y *Relicinopsis* (Fig. 12M, N)

De las 59 especies se han estudiado tres (*Relicina limbata*, *Relicinopsis intertexta*, *R. rahegensis*) con MO. Las esporas son pequeñas (7,5-8,5 μm x 4,0-5,0 μm), elipsoidales ($L/A = 1,54 - 1,72$), con pared fina (400 nm) y con vacuoma elipsoidal o reniforme.

Género *Melanelixia* (Fig. 10J, K y 23A,B,F)

De las quince especies se han estudiado tres (*M. calva*, *M. glabra*, *M. glabratuloides*) con MO y dos (*M. glabra*, *M. glabratuloides*) con el TEM. Las esporas son medianas hasta grandes (9,5-16,0 μm x 6,0-11,0 μm), anchamente elipsoidales ($L/A = 1,46 - 1,51$), con pared fina hasta mediana (500-800 nm) y vacuoma elipsoidal o heterogéneo. La ultraestructura de la pared muestra cuatro capas, el endosporio de unos 70-150 nm, la pared propia de 150-250 nm, y el perisporio compuesto de dos capas, cada una de unos 100-120 nm.

Género *Melanohalea* (Fig. 10M y 24C-E)

De las 19 especies se han estudiado dos (*M. exasperata*, *M. subaurifera*) con el MO y con el TEM. Las esporas son medianas (10,0-12,0 μm x 7,0-8,5 μm), anchamente elipsoidales ($L/A = 1,44 - 1,48$), con pared fina hasta mediana (500-700 nm) y vacuoma elipsoidal. En la ultraestructura de la pared se observan sólo tres capas, cada una de aproximadamente un tercio del grosor total de la pared. El endosporio no se diferencia de la pared propia y entre ambas tienen 220-250 nm de grosor. El perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 100-150 nm.

Género *Emodomelanelia* (Fig. 10L)

Se ha estudiado la única especie del género, la especie tipo (*E. masonii*) con el MO. Las esporas son grandes (16,0-18,0 μm x 8,5-9,5 μm), elipsoidales ($L/A = 1,86$), con pared fina (400-500 nm) y vacuoma heterogéneo.

Grupo monofilético formado por el género *Pleurosticta* (Fig. 10P) y el grupo “*Melanelia*” 1 (Fig. 10N, O y 24C, D)

Se ha estudiado la especie tipo del género *Pleurosticta* (*P. acetabulum*) con el MO. Las esporas son medianas (13,0-15,0 μm x 7,5-8,5 μm), elipsoidales ($L/A = 1,71$), con pared fina (400-500 nm) y vacuoma heterogéneo.

De las siete especies del grupo “*Melanelia*” 1 se han estudiado dos (“*M.*” *panniformis*, “*M.*” *tomini*) con el MO y una (“*M.*” *panniformis*) con el TEM. Las esporas

son pequeñas hasta medianas (9,0-12,0 μm x 4,5-6,5 μm), elipsoidales en "*M.*" *tomini* (L/A = 1,63) y alargadas en "*M.*" *panniformis* (L/A = 2,34), ambas con pared fina (400-600 nm) y vacuoma elipsoidal o heterogéneo. En la ultraestructura de la pared se observan tres capas, cada una de aproximadamente un tercio del grosor total de la pared. El endosporio no se diferencia de la pared propia y entre ambas capas tienen 220-250 nm de grosor. El perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 70-150 nm.

Géneros estudiados no pertenecientes al clado parmelioides de la familia *Parmeliaceae*:

Clado cetrarioide

Género *Melanelia* (Fig. 13A y 24A,B)

Se ha estudiado la especie tipo (*M. stygia*) con el MO y con el TEM. Las esporas son pequeñas (7,0-8,0 μm x 4,5-5,5 μm), anchamente elipsoidales (L/A = 1,48), con pared fina (400-500 nm) y con vacuoma homogéneo o reniforme. En la ultraestructura de la pared se observan tres capas, cada una de aproximadamente un tercio del grosor total de la pared. El endosporio no se diferencia de la pared propia y el grosor de ambas capas es de 220-250 nm. El perisporio está compuesto de dos capas, cada una de unos 70-150 nm.

Género *Cetraria*

Se ha estudiado una especie (*C. crespoae*) con el MO. Las esporas son pequeñas (6,9-7,5 μm x 3,5-4,0 μm), estrechamente elipsoidales (L/A = 1,90), con pared fina (300-400 nm) y con vacuoma reniforme.

Clado hipogimnioide

Género *Pseudevernia* (Fig. 13E-G)

De las cuatro especies se han estudiado tres (*P. consocians*, *P. furfuracea*, *P. intensa*) con MO. Las esporas son pequeñas (6,0-8,0 μm x 4,0-5,0 μm), anchamente elipsoidales hasta elipsoidales (L/A = 1,49 - 1,68), con pared muy fina (300-400 nm) y vacuoma elipsoidal o reniforme.

Género *Hypogymnia* (Fig. 13H)

De las cincuenta especies se han estudiado dos (*H. wattiana*, *H.sp.*) con MO. Las esporas son pequeñas / medianas (8,5-10,5 μm x 6,0-8,0 μm), elipsoidales (L/A = 1,55) o subglobosas (L/A = 1,05), con pared muy fina (300-400 nm) y vacuoma elipsoidal.

Género *Brodoa* (Fig. 13I)

De las tres especies se ha estudiado la especie tipo (*B. atrofusca*) con MO. Las esporas son pequeñas (6,0-7,0 μm x 5,5-6,5 μm), subglobosas ($L/A = 1,09$), con pared muy fina (300-400 nm) y vacuoma elipsoidal o reniforme.

Clado usneoide

Género *Usnea* (Fig. 13J)

De las más que quinientas especies se ha estudiado una especie (*U. florida*) con MO. Las esporas son medianas (9,5-10,5 μm x 6,0-7,0 μm), elipsoidales ($L/A = 1,55$), con pared fina (400 nm) y vacuoma elipsoidal.

Otros géneros

Género *Platismatia* (Fig. 13B, C y 24E, F)

De las diez especies se han estudiado dos (*P. glauca*, *P. stenophylla*) con MO y una (*P. glauca*) con el TEM. Las esporas son pequeñas (6,0-7,0 μm x 4,0-4,5 μm), anchamente elipsoidales ($L/A = 1,50 - 1,54$), con pared muy fina (400 nm) y vacuoma elipsoidal y en algunos casos reniforme. En la ultraestructura de la pared se observan cuatro capas. El endosporio de unos 70-100 nm, la pared propia de 70-100 nm, y el perisporio compuesto de dos capas, la interna de 50 nm y la externa de unos 50-100 nm.

Género *Imshaugia* (Fig. 13D)

Se ha estudiado la especie tipo (*I. aleurites*) con el MO. Las esporas son pequeñas (5,5-6,5 μm x 3,5-4,5 μm), estrechamente elipsoidales ($L/A = 1,90$), con pared fina (300-400 nm) y con vacuoma reniforme.

Género *Protoparmelia* (Fig. 13K, M, O y 25)

De las veinte especies se han estudiado tres (*P. badia*, *P. nitens*, *P. rhombosporea*) con MO y una (*P. badia*) con el TEM. Las esporas son medianas (10,0-13,0 μm x 3,0-5,0 μm), muy alargadas ($L/A = 2,57 - 2,97$), con pared de muy fina (200 nm) y vacuoma reniforme. La ultraestructura de la pared presenta cuatro capas, cada una formando una cuarta parte del grosor total de la pared, 50-70 nm. La superficie externa de la espora esta rodeada por muchas membranas.

Tipología de las esporas parmelioides

En función de las medidas de longitud y anchura de las esporas (MO), del tipo de vacuoma, del grosor (MO y TEM) y estructuración en capas de las esporas (TEM) podemos dividir las esporas parmelioides en 5 tipos:

Tipo I representado por las esporas pequeñas (7,0-10,0 μm x 4,5-5,5 μm), con pared estrecha (400-500 nm) y vacuoma elipsoidal, reniforme o arachiforme. Aquí se incluyen todas las especies del género, *Bulbothrix* s.str. (Fig. 11I, J), *Cetrariastrum* (Fig. 9M, N), *Hypotrachyna* s.str. (Fig. 9G), *Parmelina* (Fig. 11M, P), *Relicina* (Fig. 12L), *Relicinopsis* (Fig. 12M, N), *Xanthoparmelia* (Fig. 10A-I) y algunas especies del grupo “*Hypotrachyna*” 2 (Fig. 9I, J), “*Melanelia*” 1 (Fig. 10N). Las capas de la pared de la espota, desde dentro hacia fuera, tienen las siguientes características:

- endosporio de 70-100 nm de grosor
- pared propia de 100-200 nm de grosor
- perisporio, con capa interna electrón-densa de 70-150 nm y externa electrón-transparente de 50-70 nm en el caso de *Parmelina* y de 70-120 nm en las demás especies del grupo.

Tipo II representado por las esporas medianas (10,0-15,0 μm x 5,0-9,5 μm), con pared estrecha hasta mediana (400-900 nm) y vacuoma elipsoidal, reniforme o heterogéneo. Aquí se incluyen especies del género y/o grupo *Austroparmelia* (Fig. 8L-P), “*Bulbothrix*” 1 (Fig. 11F, G), *Canoparmelia* s. str. (Fig. 8C), *Crespoa* (Fig. 8D, E), *Flavopunctelia* (Fig. 9D), “*Hypotrachyna*” 1 (Fig. 9F), *Melanelixia* (Fig. 10J, K), *Melanohalea* (Fig. 10M), *Myelochroa* (Fig. 11K, L), *Parmelinella* (Fig. 11H), *Parmeliopsis* (Fig. 12Q), *Pleurosticta* (Fig. 10P), *Punctelia* (Fig. 9A-C), y algunas especies de los géneros y/o grupos *Everniastrum lipidiferum* (Fig. 9L), *Flavoparmelia* (Fig. 8H-K), “*Hypotrachyna*” 1 (Fig. 9F), “*Hypotrachyna*” 2 (Fig. 9H), “*Melanelia*” 1 (Fig. 10O), *Notoparmelia* (Fig. 12H-K), *Parmelinopsis*, *Remototrachyna* (Fig. 11C-E). Las capas de la pared de la espota, desde dentro hacia fuera, tienen las siguientes características:

- endosporio de 100-200 nm de grosor
- pared propia de 150-200 nm de grosor
- perisporio, con capa interna electrón-densa de 150-300 nm y externa electrón-transparente 100-200 nm

Tipo III representado por las esporas medianas y grandes (12,0-20,5 μm x 6,5-16,5 μm), con pared ancha hasta muy ancha (>1000 nm) y vacuoma elipsoidal o heterogéneo. Aquí se incluye la mayoría de las esporas de los géneros *Parmelia* s.str. (Fig. 12B-E) y *Parmotrema* (Fig. 8B) y especies *Everniastrum cirrhatum*, *Flavoparmelia caperata* (Fig. 8G), *Notoparmelia crambidiocarpa* (Fig. 12G), *Parmelinopsis horrescens* (Fig. 9E) y *Remototrachyna adducta* (Fig. 11A). Las capas de la pared de la espora, desde dentro hacia fuera, tienen las siguientes características:

- endosporio de 200-300 nm de grosor
- pared propia de 150-250 nm de grosor
- perisporio, con capa interna electrón-densa de 250-350 nm y externa electrón-transparente de 150-200 nm en *Notoparmelia crambidiocarpa*, 300-350 nm en *Flavoparmelia* y *Parmotrema* y de 700-900 nm en *Parmelia saxatilis*.

Tipo IV representado por las esporas muy grandes (>20,5 μm x >10,5 μm), con pared muy ancha (2500-3000 nm) y vacuoma heterogéneo. Aquí se incluyen algunas especies como *Parmelia adaugescens* (Fig. 12A) y *Parmotrema thompsonii* (Fig. 8A). La ultraestructura de la pared de estas especies no ha sido estudiada.

Tipo V representado por las esporas grandes y muy grandes (>15,0 μm x >4,5 μm), con pared estrecha hasta mediana (400-800 nm) y vacuoma elipsoidal o heterogéneo. Aquí se incluyen *Austroparmelina macrospora* (Fig. 8Q), *Emodomelanelia masonii* (Fig. 10L), *Everniastrum rhizodendroidum* (Fig. 9K), *Flavoparmelia diffractaica* (Fig. 8F), *Nipponoparmelia laevior* y *N. ricasolioides* (Fig. 12O, P).

Las capas de la pared de la espora, desde dentro hacia fuera, tienen las siguientes características:

- endosporio de 100-150 nm de grosor
- pared propia de 150-180 nm de grosor
- perisporio, compuesto de dos capas, capa interna electrón-densa de 120-280 nm y externa electrón-transparente de unos 70-120 nm

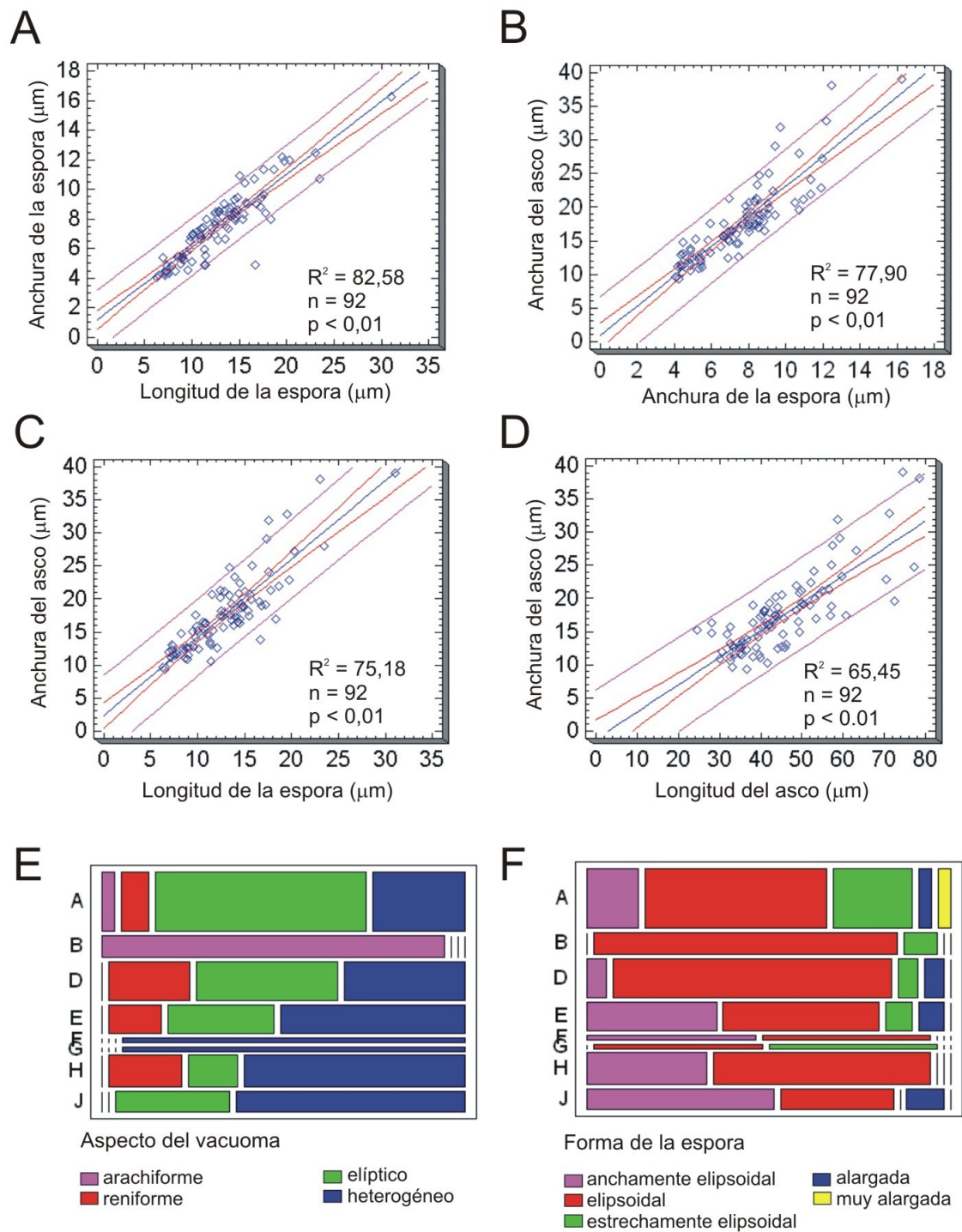


Figura 5 – Representación gráfica de características esporales en el clado parmelioides ($n = 92$). **A.** Relación lineal entre la longitud y la anchura de las esporas. **B.** Relación lineal entre la anchura de la espora y anchura del asco. **C.** Relación lineal entre la longitud de la espora y anchura del asco. **D.** Relación lineal entre la longitud y la anchura de los ascos. **E.** Distribución del tipo de vacuoma en cada clado según su aspecto. **F.** Distribución de forma de la espora en cada clado según el coeficiente L/A .

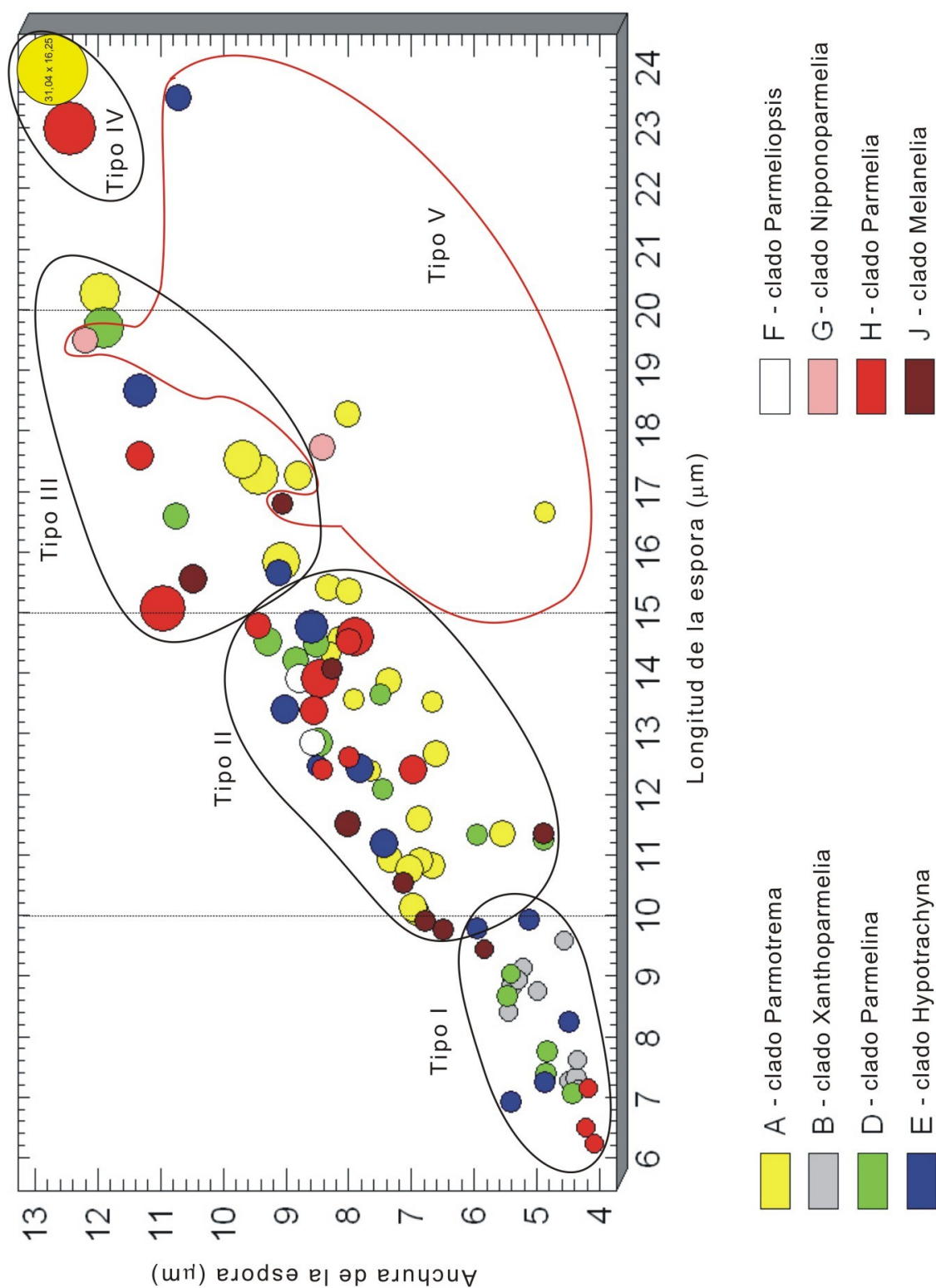


Figura 6 – Representación gráfica de distribución de distintos tipos de espora en el clado parmelioides ($n = 92$). Se representa mediante relación entre la longitud y la anchura de las esporas. El tamaño de las burbujas está acorde al grosor de la pared de la espora. El color de las burbujas caracteriza cada uno de los clados parmelioides estudiados.

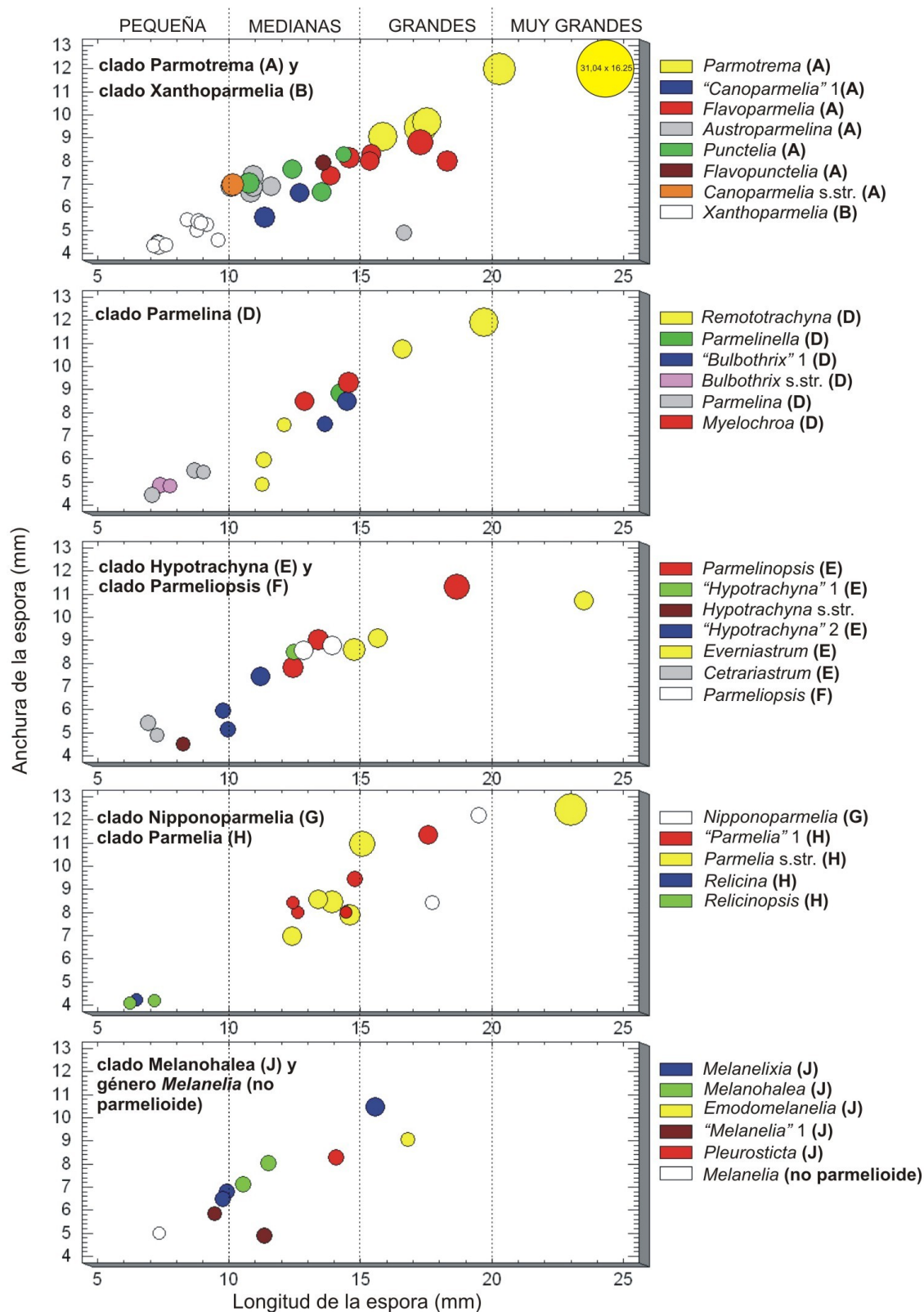


Figura 7 – Representación gráfica de distribución de esporas en cada uno (o en conjunto de dos clados) de los clados parmelioides (n = 92). Se representa mediante relación entre la longitud y la anchura de las esporas. El tamaño de las burbujas está acorde al grosor de la pared de la espora. El color de las burbujas caracteriza cada uno de los géneros o grupos estudiados.

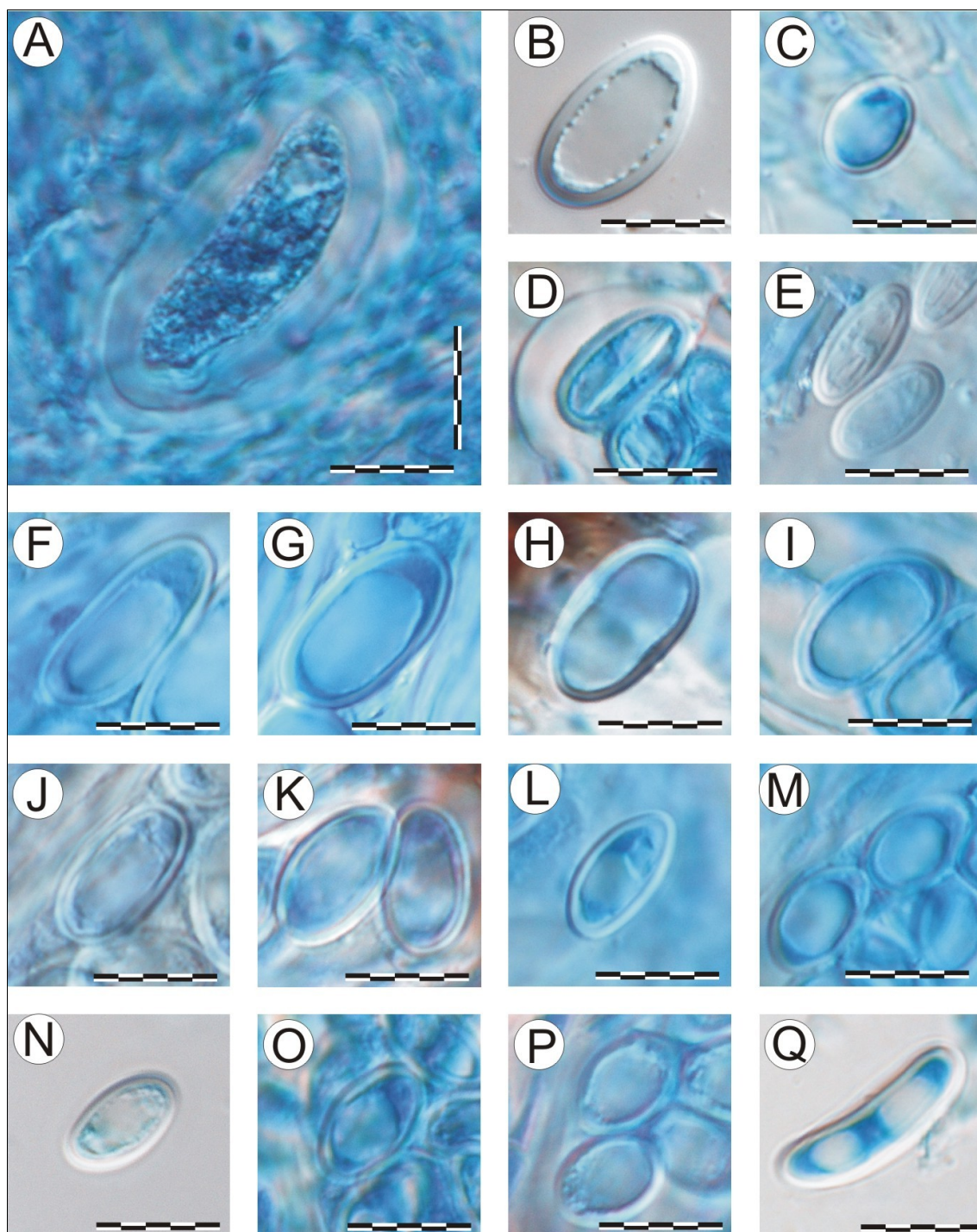


Figura 8 – Clado Parmotrema (1.parte); escala = 10µm

A. – B. *Parmotrema* A. *P. thompsonii* B. *P. nilgherrense* C. *Canoparmelia* s. str. C. *C. texana* D. – E. *Crespoa* 1 D. *C. inhaminensis* E. *C. schelpei* F. – K. *Flavoparmelia* F. *F. diffractaica* G. *F. caperata* H. *F. virensica* I. *F. secalonica* J. *F. rutidota* K. *F. ferax* L. – Q. *Austroparmelina* L. *A. pruinata* M. *A. norpruinata* N. *A. pseudorelicina* O. *A. elixia* P. *A. endoleuca* Q. *A. macrospora*

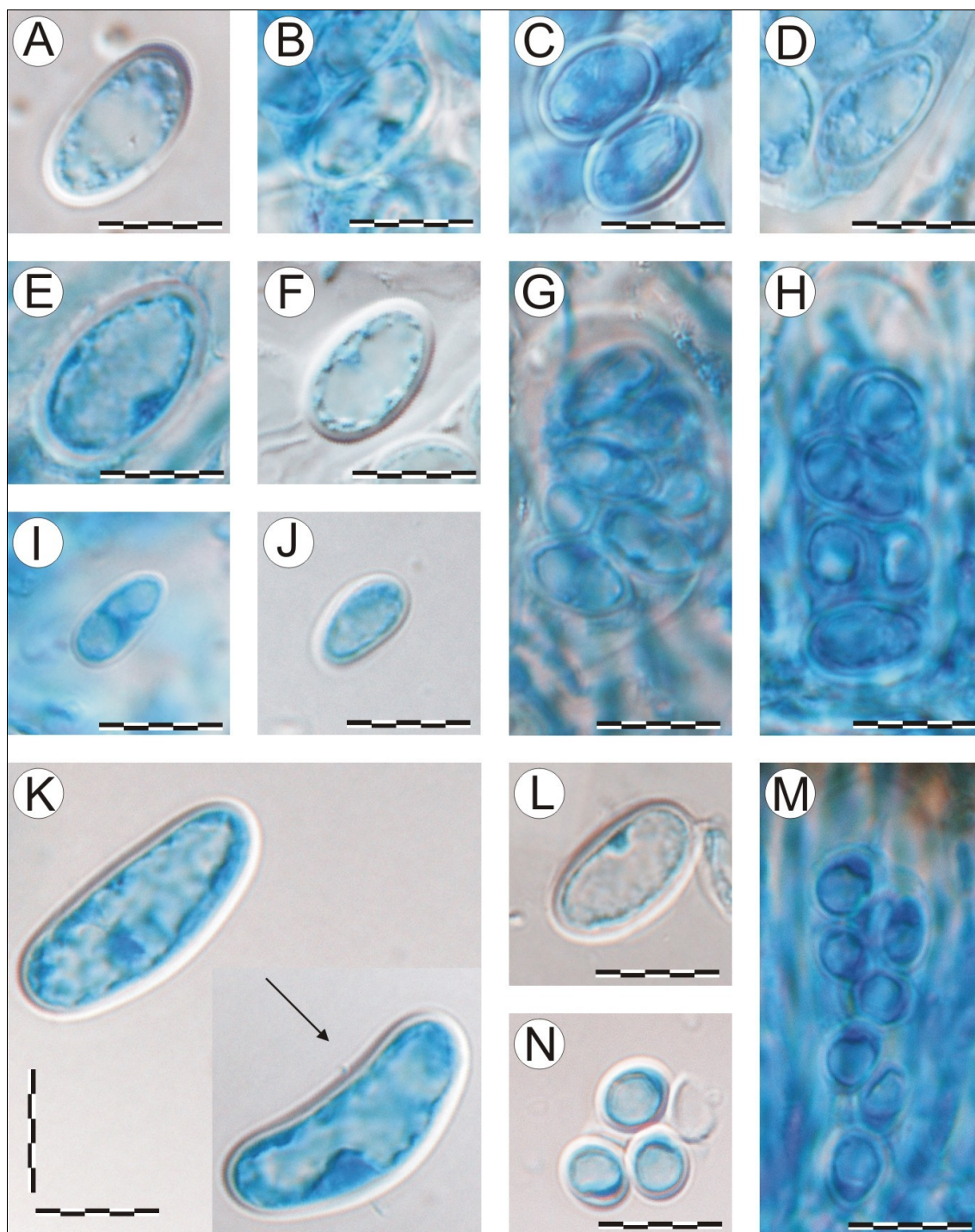


Figura 9 – Clado Parmotrema (cont.; A-D) y clado Hypotrachyna (E-N; escala = 10μm
A. – C. *Punctelia* A. *P. hypoleucites* B. *P. macrospora* C. *P. subflava* D. *Flavopunctelia*
darrowii E. *Parmelinopsis horrescens* F. “*Hypotrachyna*” 1, “*H.*” *revoluta* G.
Hypotrachyna s.str., *H. osseoalba* H. – J. “*Hypotrachyna*” 2 H. “*H.*” *reducens* I. “*H.*”
physcioides J. “*H.*” *fissicarpa* K. – L. *Everniastrum* K. *E. rhizodendroidum* L. *E.*
lipidiferum M. – N. *Cetrariastrum* M. *C. andense* N. *C. ecuadoriense*

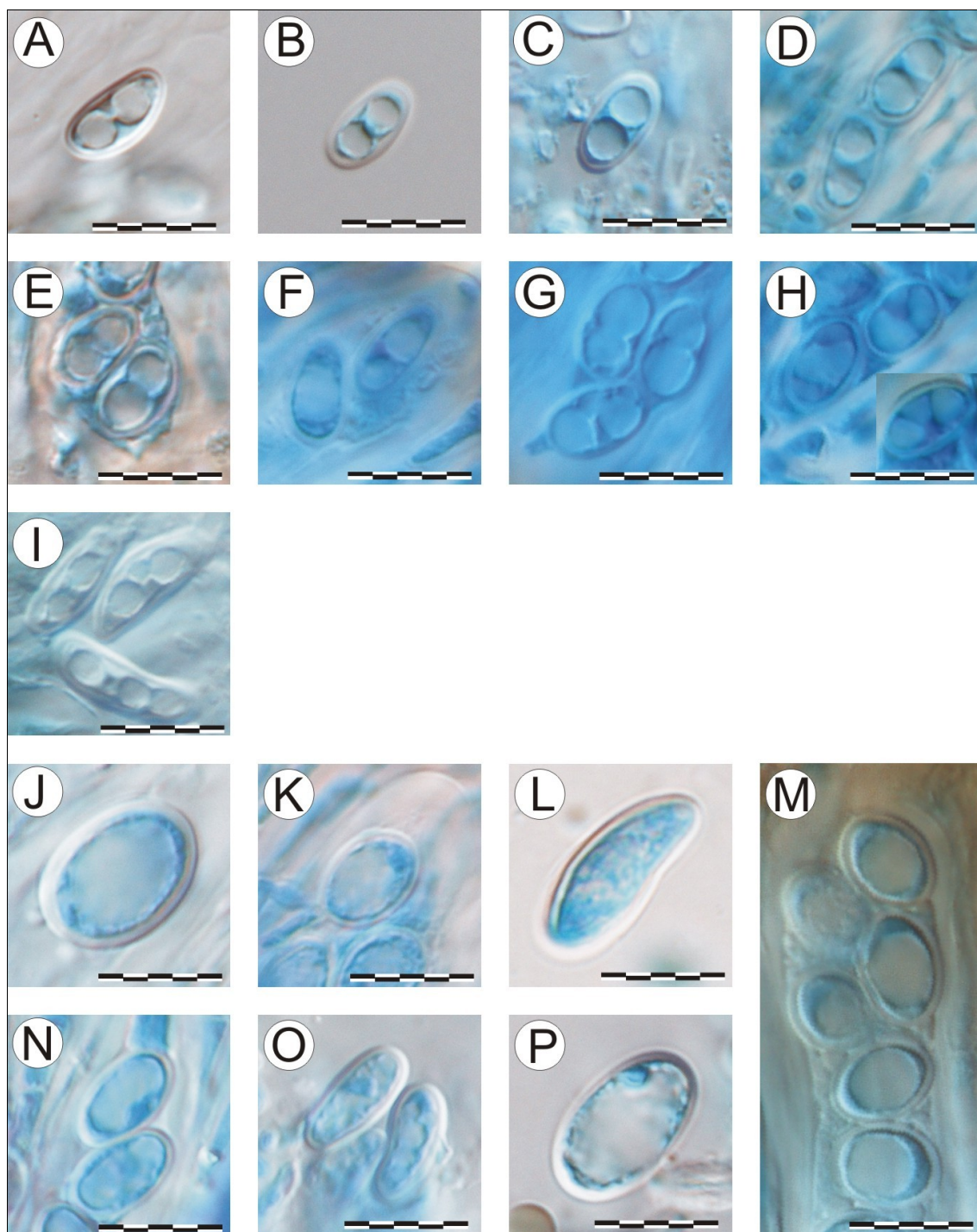


Figura 10 – Clado Xanthoparmelia (A-I) y clado Melanelia (J-P); escala = 10µm

A. – I. *Xanthoparmelia* A. *X. conspersa* B. *X. angustiphylla* C. *X. pulla* D. *X. litophila* E. *X. mexicana* F. *X. hottentotta* G. *X. exornata* H. *X. ovealmbornii* I. *X. adligans* **J. – K. *Melanelixia*** J. *M. calva* K. *M. glabratuloides* **L. *Emodomelanelia*** *masonii* **M. *Melanohalea*** *exasperata* **N. – O. “*Melanelia*”** 1 N. “*M.*” *tomini* O. “*M.*” *panniformis* **P. *Pleurosticta*** *acetabulum*

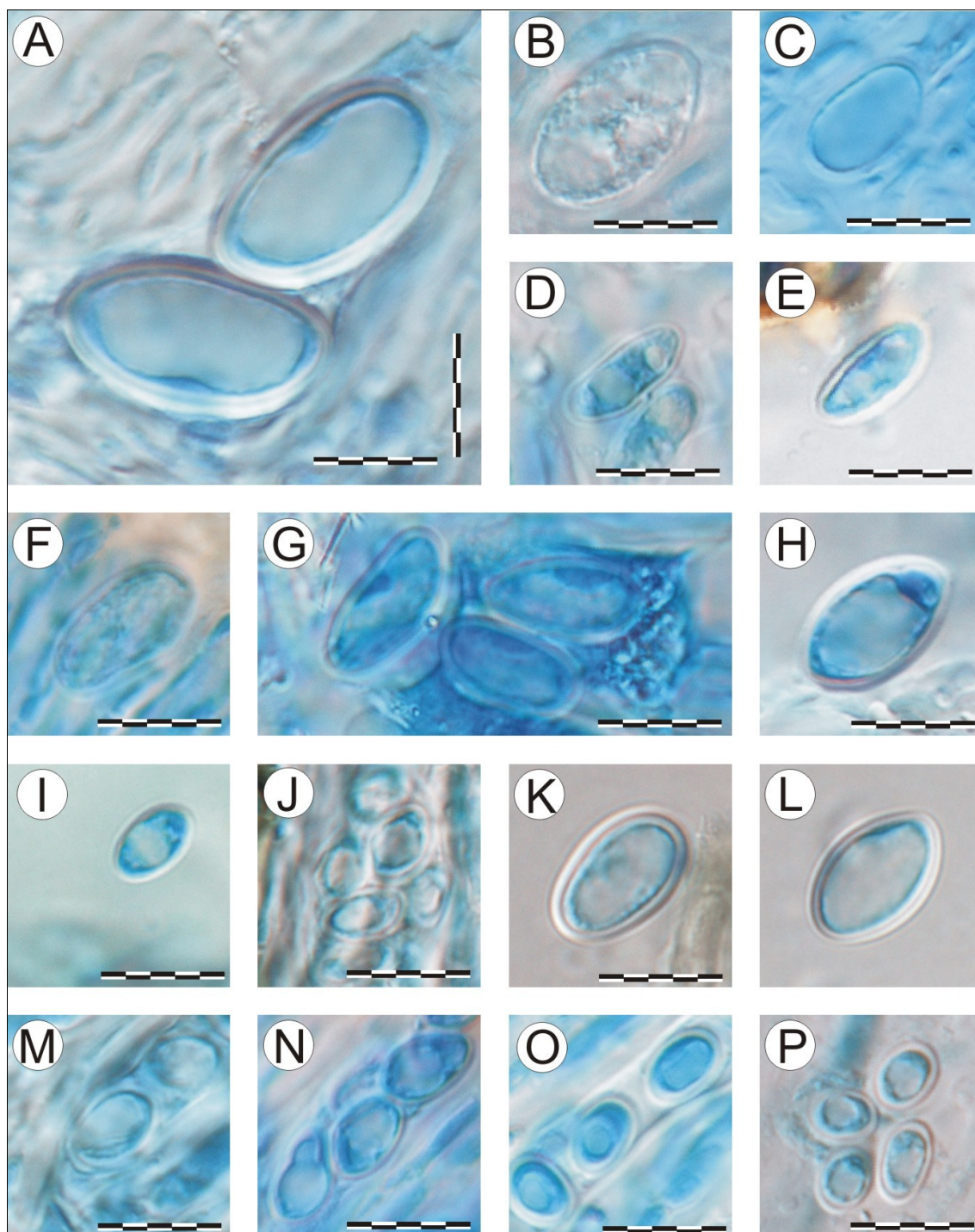


Figura 11 – Clado Parmelina; escala = 10µm

A. – E. *Remototrachyna* A. *R. adducta* B. *R. flexilis* C. *R. incognita* D. *R. kingii* E. *R. scytophylla* F. – G. ***“Bulbothrix”*** 1 F. *“B.” meizospora* G. *“B.” setschwanensis* H. ***Parmelinella*** *wallichiana* I. – J. ***Bulbothrix*** s.str. I. *B. klementii* J. *B. coronata* K. – L. ***Myelochroa*** K. *M. irrugans* L. *M. aurulenta* M. – P. ***Parmelina*** M. *P. tiliacea* N. *P. atricha* O. *P. carporhizans* P. *P. quercina*

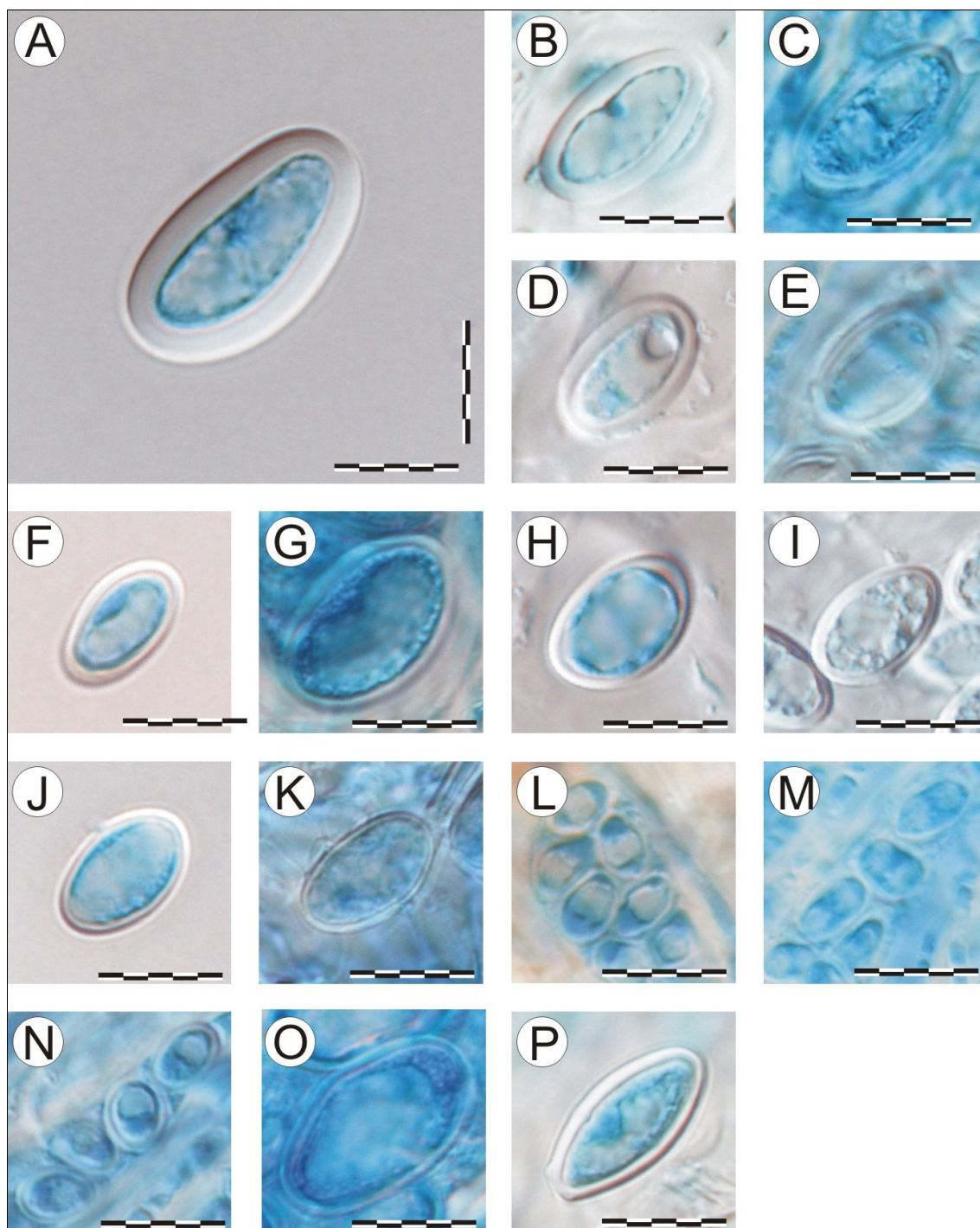


Figura 12 – Clado Parmelia (A-N), Nipponoparmelia (O-P) y Parmeliopsis (Q); escala = 10μm
A.–F. *Parmelia* s.str. A. *P. adaugescens* B. *P. saxatilis* C. *P. serrana* D. *P. omphalodes* E. *P. sulcata* F. *P. cochleata* **G.–K. *Notoparmelia*** G. *N. crambidiocarpa* H. *N. tenuirima* I. *N. signifera* J. *N. subtestacea* K. *N. erumpens*, **L. *Relicina* limbata** **M.–N. *Relicinopsis*** M. *R. intertexta* N. *R. rahegensis* **O.–P. *Nipponoparmelia*** O. *N. ricassolioides* P. *N. laevior* **Q. *Parmeliopsis* ambigua.**

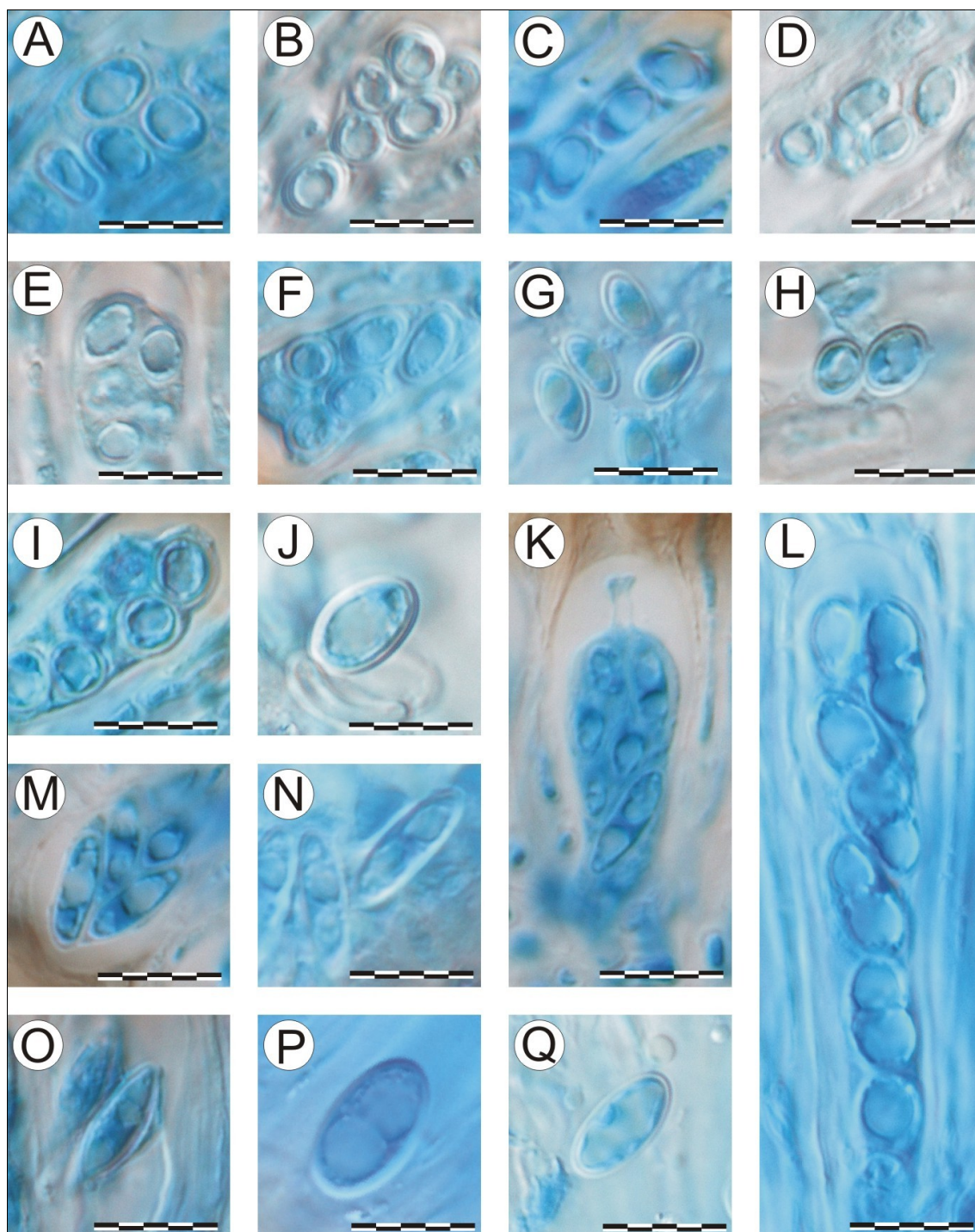


Figura 13 – Otros géneros de la familia *Parmeliaceae* (A-K, M-O) y *Lecanora* (L, P-Q); escala = 10µm

A. *Melanelia stygia* B. – C. *Platismatia* B. *P. glauca* C. *P. stenophylla* D. *Imshaugia aleurites* E. – G. *Pseudevernia* E. *P. furfuracea* F. *P. consocians* G. *P. intensa* H. *Hypogymnia* sp. I. *Brodoa atrofusca* J. *Usnea florida* K., M. – O. *Protoparmelia* K. y M. *P. badia* N. *P. nitescens* O. *P. rhombosporea* L., P. – Q. *Lecanora* L. *L. muralis* P. *L. subfuscata* Q. *L. muralis*

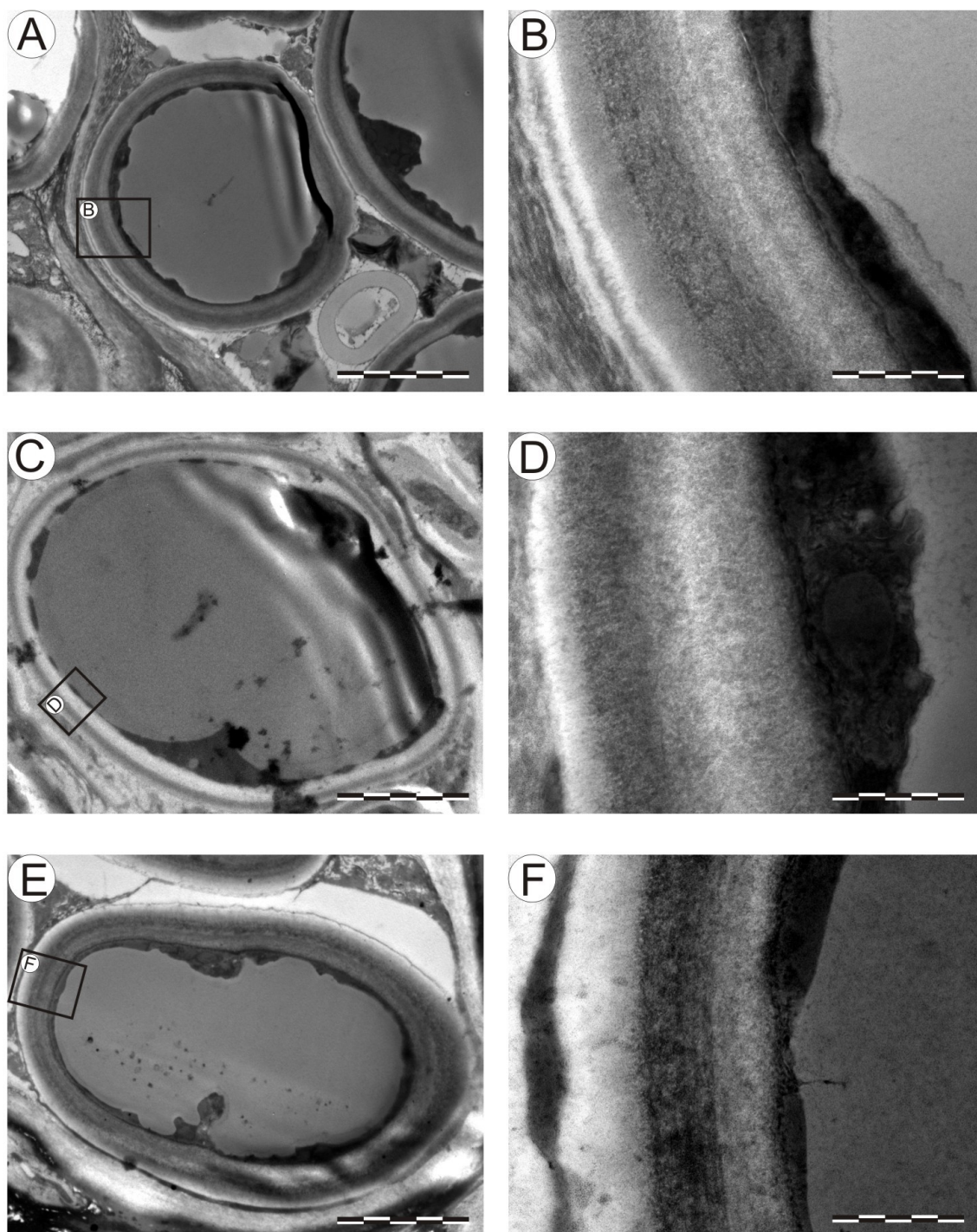


Figura 14 – *Parmotrema* y *Flavoparmelia*. **A.** Corte transversal de la espora de *Parmotrema nilgherrense*, escala = 3500 nm. **B.** Detalle de la pared esporal de *P. nilgherrense*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de la espora de *P. cetrata*, escala = 5000 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *P. cetrata*, escala = 500 nm. **E.** Corte longitudinal de la espora de *Flavoparmelia caperata*, escala = 3500 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *F. caperata*, escala = 500 nm.

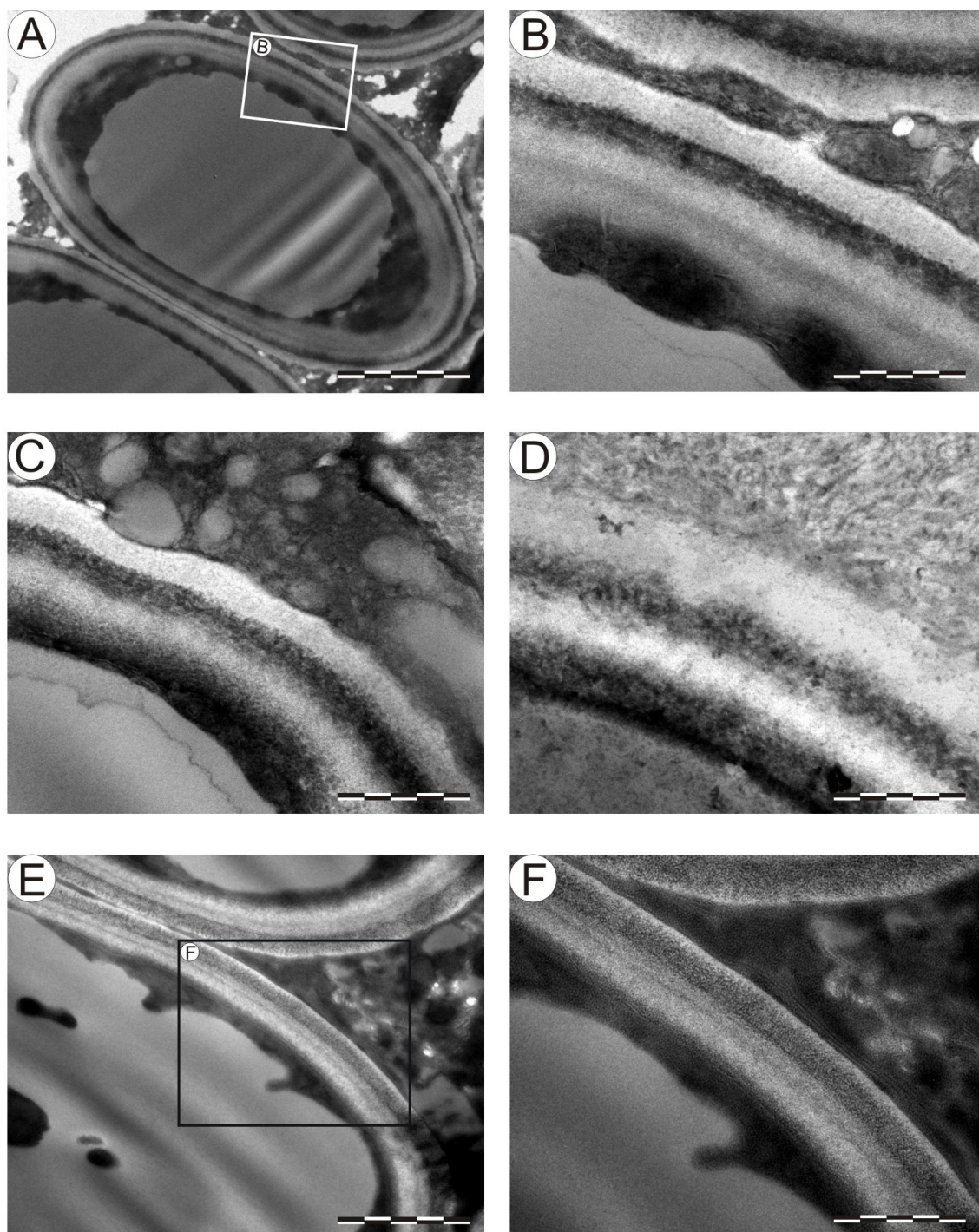


Figura 15 – *Austroparmelina* y *Punctelia*. **A.** Corte longitudinal de la espora de *Austroparmelina pseudorelicina*, escala = 2500 nm. **B. - D.** Detalle de la pared esporal, escala = 500 nm. **B.** *A. pseudorelicina*. **C.** *A. endoleuca*. **D.** *A. elixia*. **E.** Corte longitudinal de la espora de *Punctelia hypoleucites*, escala = 1000 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *P. hypoleucites*, escala = 500 nm.

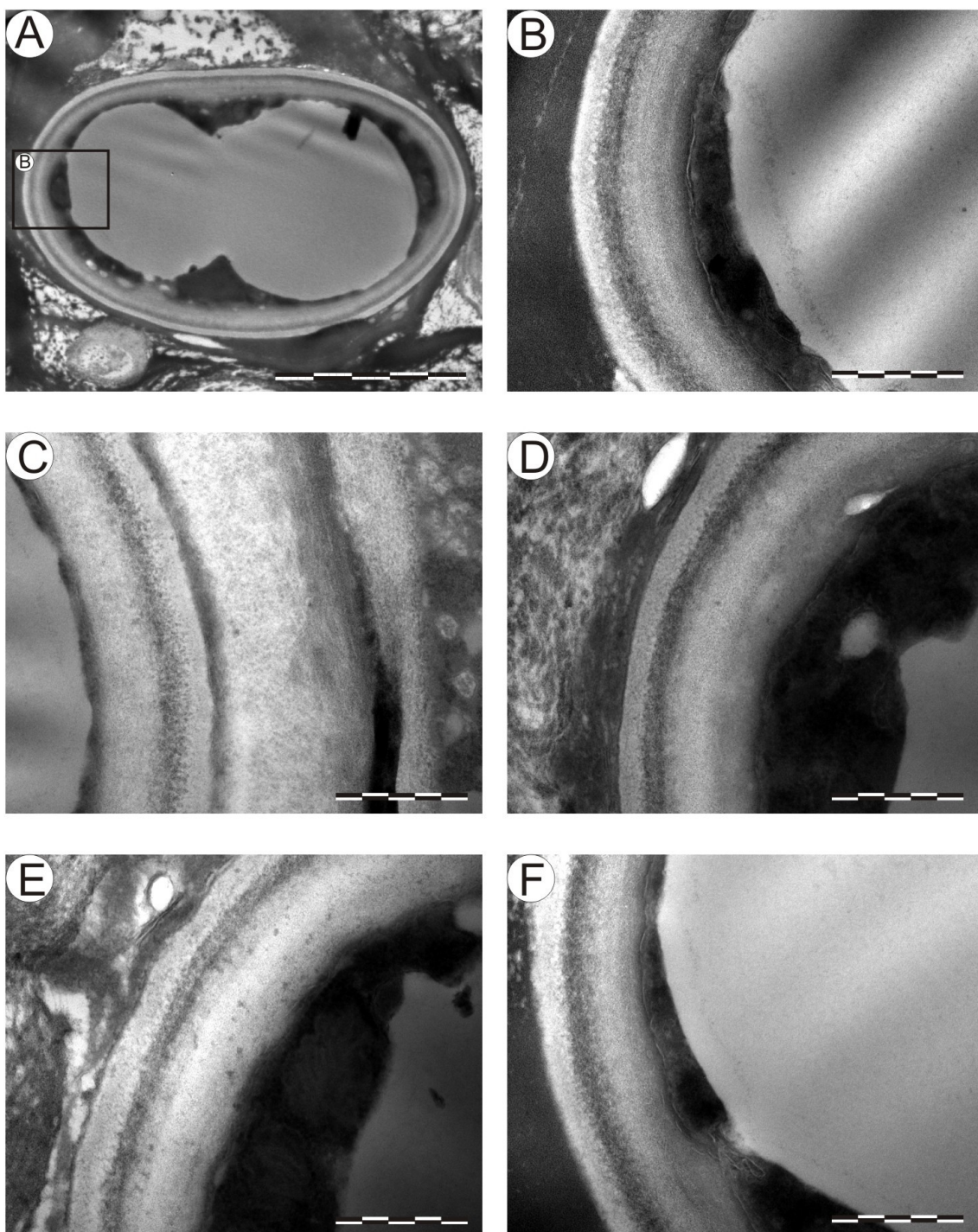


Figura 16 – *Xanthoparmelia*. **A.** Corte longitudinal de la espora de *X. angustiphylla*, escala = 2500 nm. **B. - F.** Detalle de la pared de las esporas, escala = 500 nm. **B.** *X. angustiphylla*. **C.** *X. conspersa*. **D.** *X. subincerta*. **E.** *X. litophilla*. **F.** *X. mexicana*.

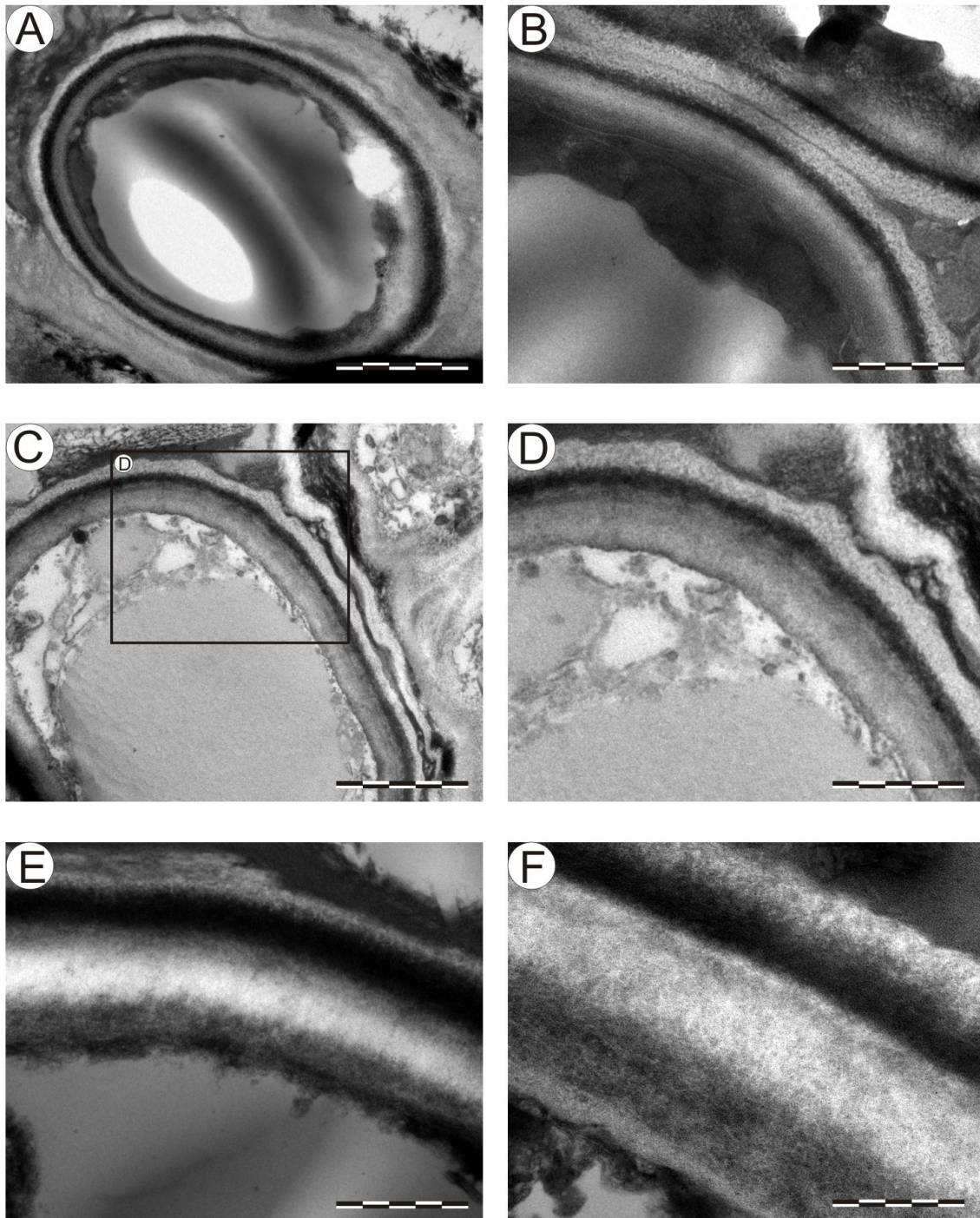


Figura 17 – *Bulbothrix* y *Remototrachyna*. **A.** Corte longitudinal de la espora de *Bulbothrix klementii*, escala = 1000 nm. **B.** Detalle de la pared esporal de *B. klementii*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de la espora de *B. coronata*, escala = 1000 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *B. coronata*, escala = 500 nm. **E.** Detalle de la pared esporal de *Remototrachyna flexilis*, escala = 500 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *R. adducta*, escala = 500 nm.

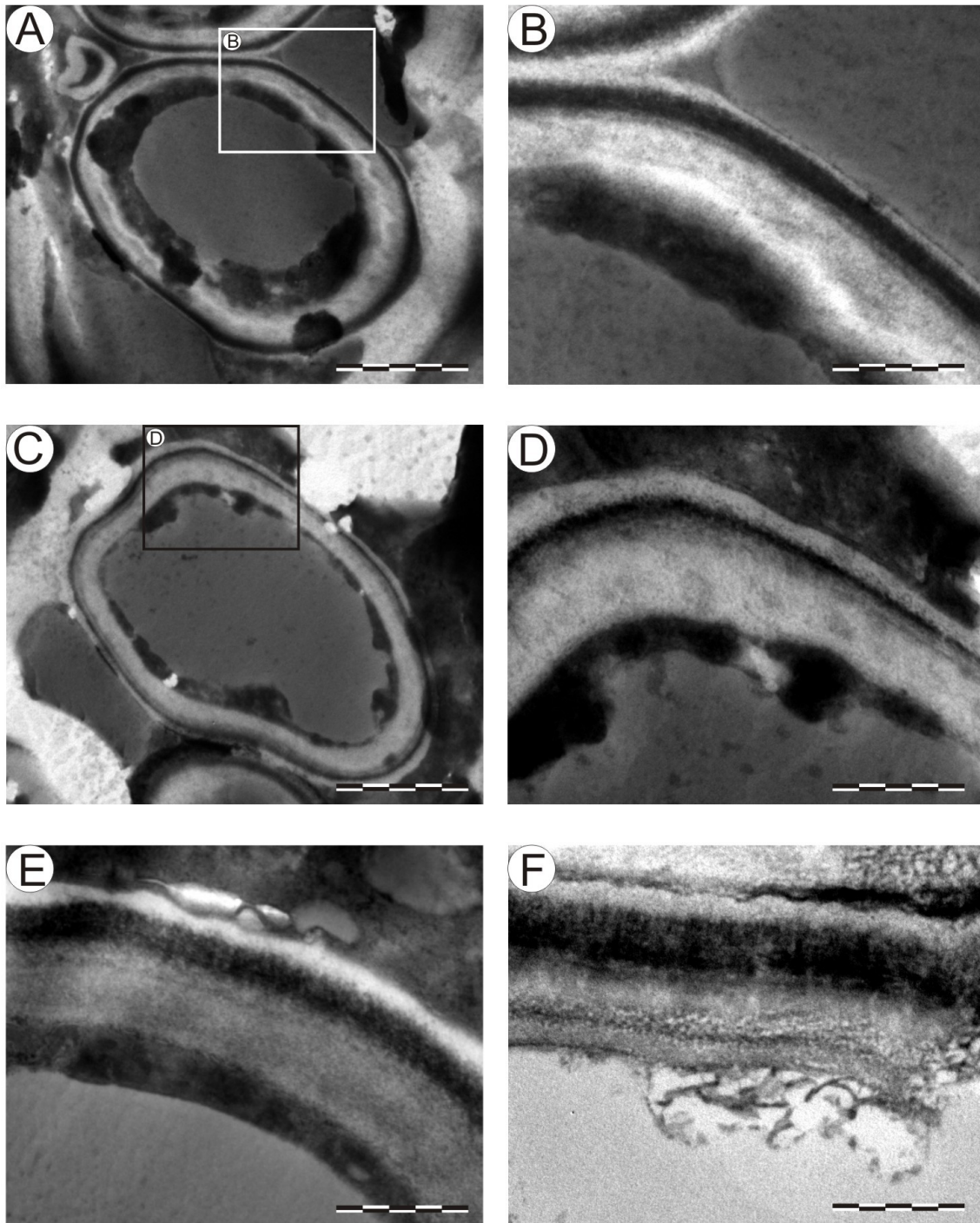


Figura 18 – *Parmelina* y *Myelochroa*. **A.** Corte longitudinal de la espora de *Parmelina quercina*, escala = 1500 nm. **B.** Detalle de la pared esporal de *P. quercina*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de la espora de *P. carporrhizans*, escala = 1500 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *P. carporrhizans*, escala = 500 nm. **E.** Detalle de la pared esporal de *Myelochroa galbiniana*, escala = 500 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *M. irrugans*, escala = 500 nm.

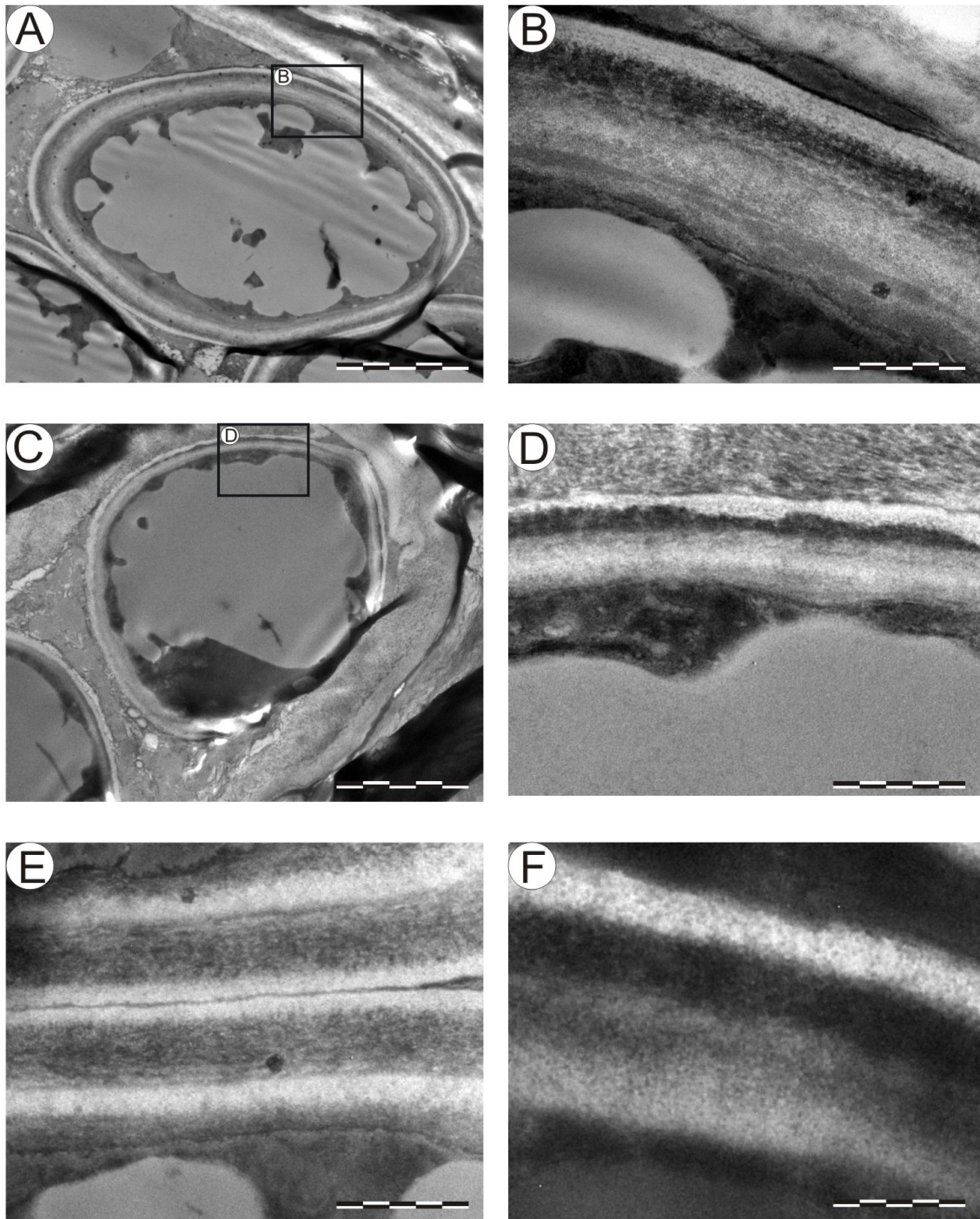


Figura 19 – *Parmelinopsis* y *Hypotrachyna*. **A.** Corte longitudinal de la espóra de *Parmelinopsis subfatiszens*, escala = 2500 nm. **B.** Detalle de la pared esporal de *P. subfatiszens*, escala = 500 nm. **C.** Corte transversal de la espóra de *Hypotrachyna revoluta*, escala = 3000 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *H. revoluta*, escala = 500 nm. **E.** Detalle de las paredes de dos esporas de *H. reducens*, escala = 500 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *Parmelinopsis horrescens*, escala = 500 nm.

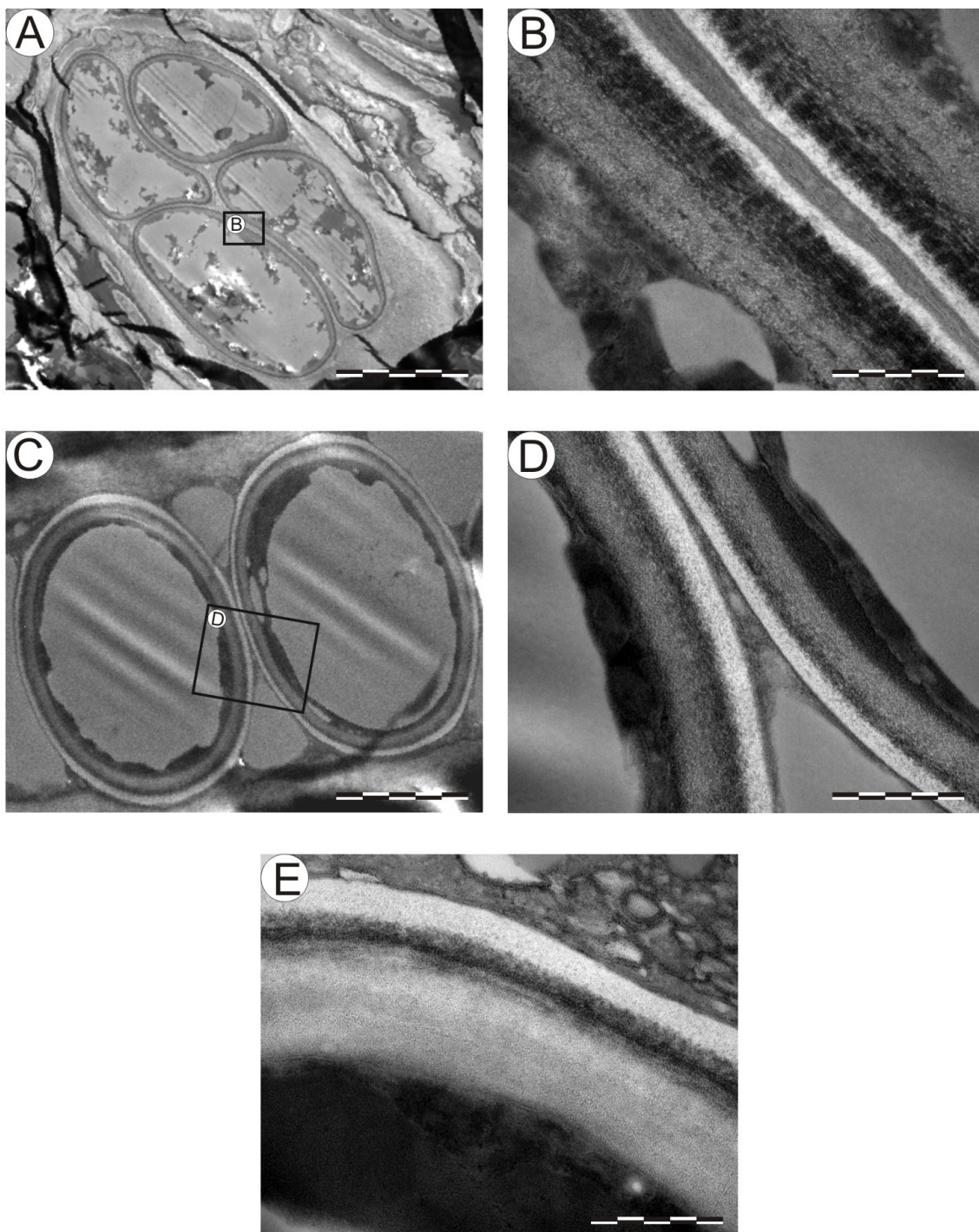


Figura 20 –*Everniastrum*, *Cetrariastrum* y *Parmeliopsis*. **A.** Corte longitudinal del asco y las esporas de *Everniastrum rhizodendroidum*, escala = 1000 nm. **B.** Detalle de las paredes de dos esporas de *E. rhizodendroidum*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de dos esporas de *Cetrariastrum ecuadoriense*, escala = 2000 nm. **D.** Detalle de laas paredes de dos esporas de *C. ecuadoriense*, escala = 500 nm. **E.** Detalle de la pared esporal de *Parmeliopsis ambigua*, escala = 500 nm.

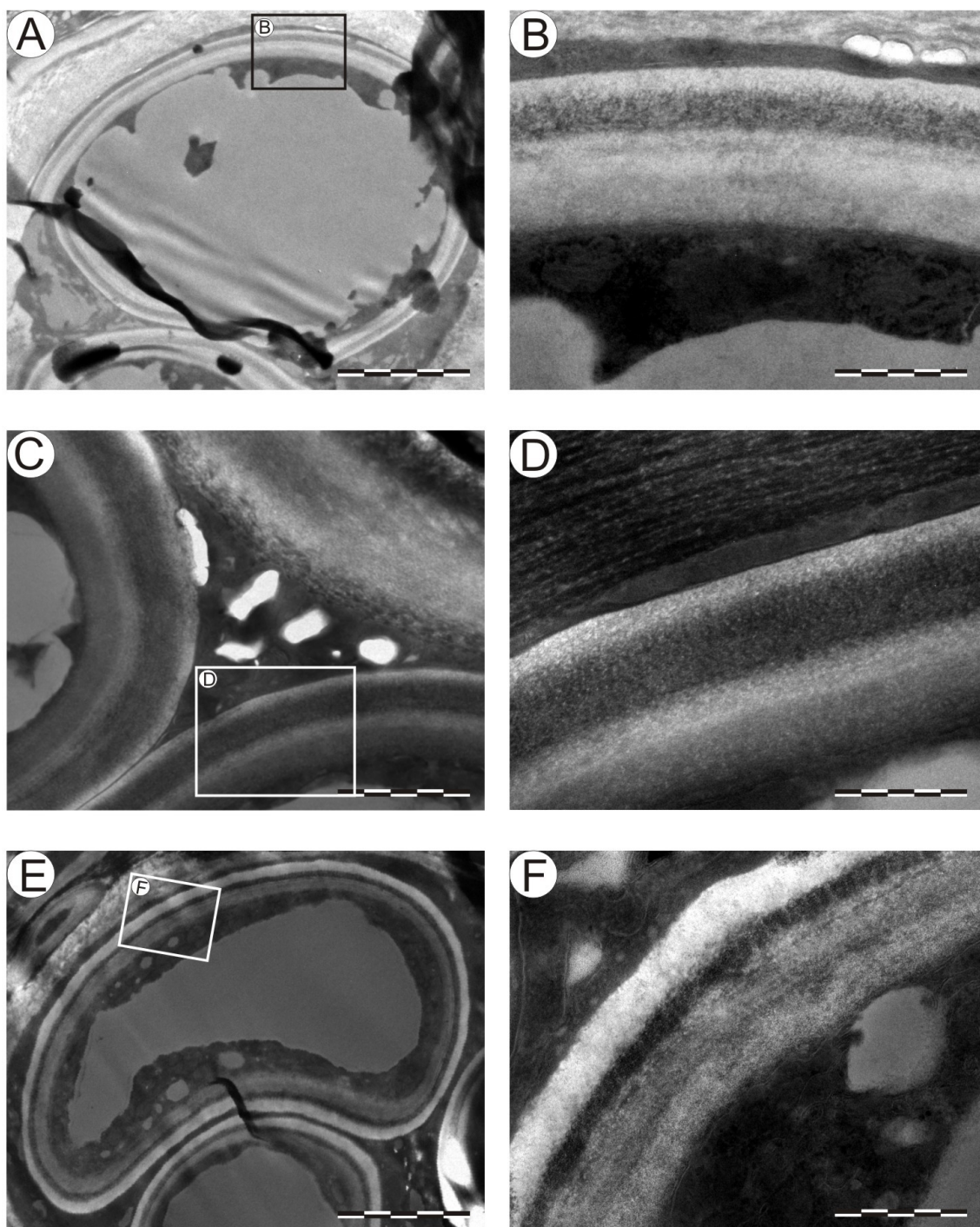


Figura 21 – *Notoparmelia* y *Nipponoparmelia*. **A.** Corte transversal de la espóra de *Notoparmelia signifera*, escala = 3000 nm. **B.** Detalle de la pared esporal de *N. signifera*, escala = 500 nm. **C.** Pared esporal de *N. crambidiocarpa*, escala = 1000 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *N. crambidiocarpa*, escala = 500 nm. **E.** Corte longitudinal de la espóra de *Nipponoparmelia laevior*, escala = 2000 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *N. laevior*, escala = 500 nm.

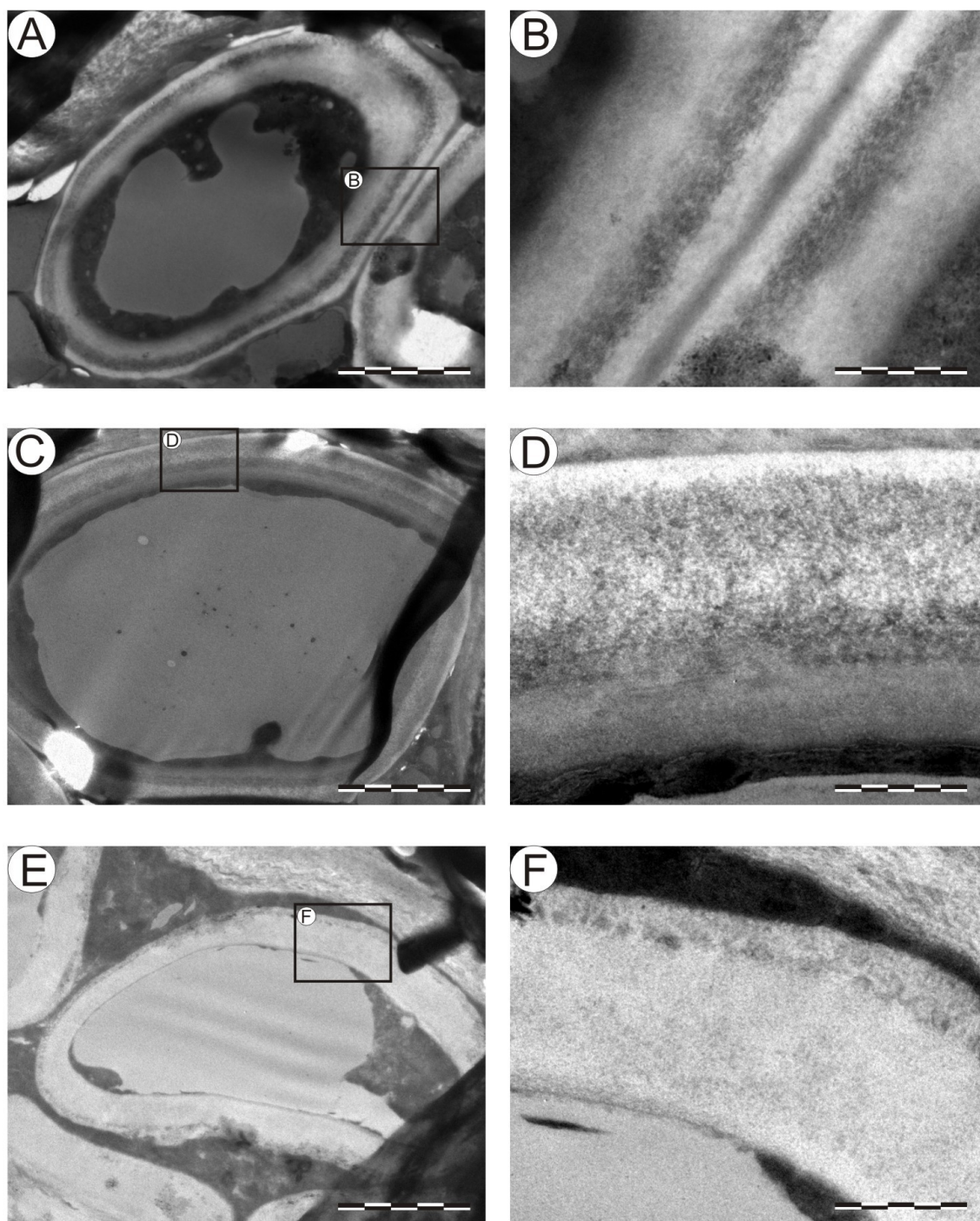


Figura 22 – *Parmelia* s.str. **A.** Corte longitudinal de la espora de *P. cochleata*, escala = 2000 nm. **B.** Detalle de las paredes de dos esporas de *P. cochleata*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de la espora de *P. saxatilis*, escala = 2500 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *P. saxatilis*, escala = 500 nm. **E.** Corte longitudinal de la espora inmadura de *P. omphalodes*, escala = 2000 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *P. omphalodes*, escala = 500 nm.

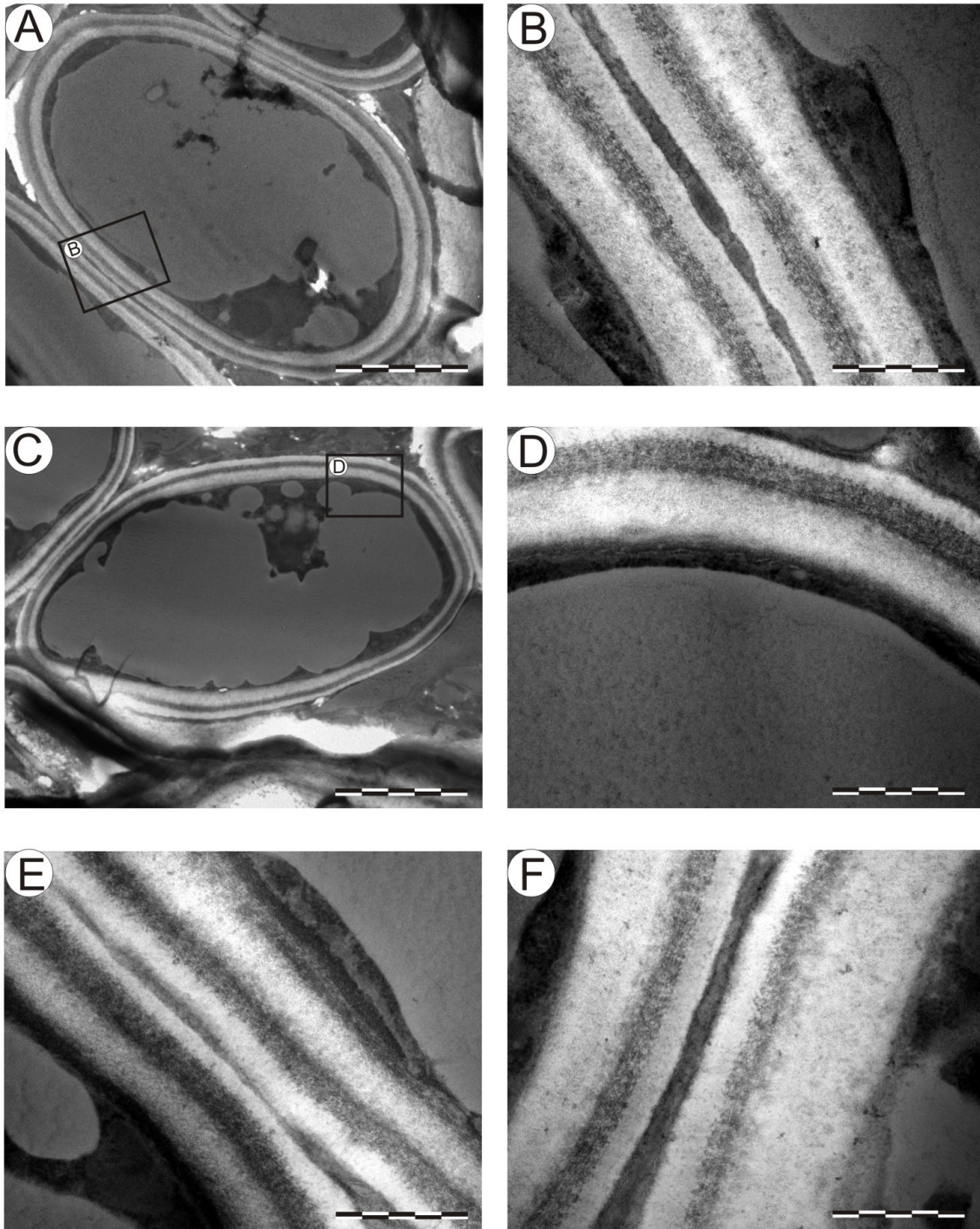


Figura 23 – *Melanelixia* y *Melanohalea*. **A.** Corte longitudinal de la espóra de *Melanelixia glabra*, escala = 2500 nm. **B.** Detalle de las paredes de dos esporas de *M. glabra*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de la espóra de *Melanohalea exasperata*, escala = 2500 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de *M. exasperata*, escala = 500 nm. **E.** Detalle de las paredes de dos esporas de *M. elegantula*, escala = 500 nm. **F.** Detalle de las paredes de dos esporas de *Melanelixia fuliginosa*, escala = 500 nm.

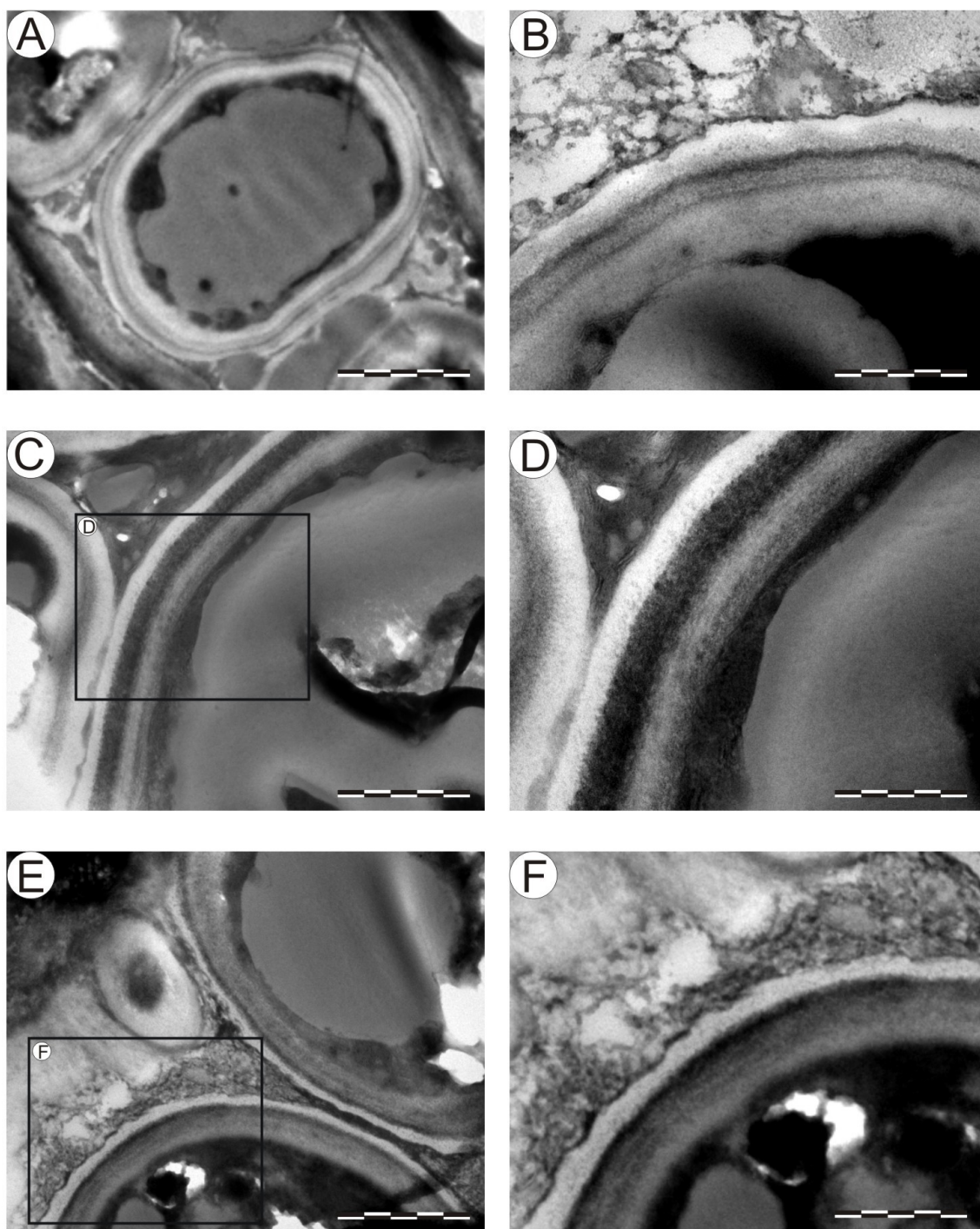


Figura 24 – *Melanelia*, “*Melanelia*” 1 y *Platismatia*. **A.** Corte longitudinal de la espora de *Melanelia stygia*, escala = 2000 nm. **B.** Detalle de la pared esporal de *M. stygia*, escala = 500 nm. **C.** Corte longitudinal de la espora de “*Melanelia*”. *panniformis*, escala = 1000 nm. **D.** Detalle de la pared esporal de “*M*”. *panniformis*, escala = 500 nm. **E.** Corte longitudinal de las esporas de *Platismatia glauca*, escala = 1000 nm. **F.** Detalle de la pared esporal de *P. glauca*, escala = 500 nm.



Figura 25 – *Protoparmelia badia*. A. Corte transversal del himenio, se aprecia un asco con las esporas en formación, escala = 2000 nm. B. Detalle del aparato apical del asco, escala = 500 nm. C. Corte longitudinal del asco con las esporas maduras, escala = 1000 nm D. Corte transversal del asco con las esporas maduras, escala = 500 nm. E. Corte transversal de las espora, escala = 1000 nm. F. Detalle de la pared esporal, escala = 500 nm.

Correlación entre el tipo de las esporas y la filogenia de la familia

Los cinco tipos de esporas se distribuyen en distintos clados como muestran las figuras 6 y 7. A lo largo del árbol filogenético (Crespo *et al.* 2010b) se distribuyen como muestra la Figura 26.

El clado A (clado Parmotrema con los géneros *Austroparmelia*, *Crespoa*, *Canoparmelia* s. str., *Flavoparmelia*, *Flavopunctelia*, *Parmotrema*, *Punctelia*) está caracterizado por las esporas de tipo II, III, IV y V. El clado B (clado Xanthoparmelia con el género *Xanthoparmelia*) está caracterizado por las esporas del tipo I. El clado C (clado Cetrelia con el único género *Cetrelia*) no ha podido ser investigado por falta de material fértil. Este género está generalmente considerado como género estéril. El clado D (clado Parmelina con *Bulbothrix* s.str., “*Bulbothrix*” 1, *Myelochroa*, *Parmelina*, *Parmelinella*, *Remototrachyna*) presenta esporas de los tipos I, II y III. El clado E (clado Hypotrachyna con *Cetrariastrum*, *Everniastrum*, *Hypotrachyna* s.str., “*Hypotrachyna*” 1, “*Hypotrachyna*” 2, *Parmelinopsis*) está caracterizado por las esporas de tipo I, II, III y V. El clado F (clado Parmeliopsis con el único género *Parmeliopsis*) presenta esporas de tipo II. El clado G (clado Nipponoparmelia con el único género *Nipponoparmelia*) presenta esporas de tipo V. El clado H (clado Parmelia con los géneros *Parmelia* s.str., *Notoparmelia*, *Relicina*, *Relicinopsis*) está caracterizado por las esporas de tipo I, II III y IV. El clado J (clado Melanohalea con los géneros *Emodomelanelia*, “*Melanelia*” 1, *Melanelixia*, *Melanohalea*, *Pleurosticta*) presenta esporas de tipo I, II, V.

Correlación entre otros caracteres finos de las esporas y la filogenia de la familia

Se observa, que en todos los clados (menos los tres monogenéricos; clado Xanthoparmelia, Parmeliopsis y Nipponoparmelia) hay por lo menos dos tipos de vacuoma (Fig. 5E). El clado Parmotrema es el más variable, presenta los cuatro tipos posibles de vacuoma. Únicamente los clados monogenéricos se pueden caracterizar por un tipo de vacuoma. Para el clado Xanthoparmelia se confirma la presencia del vacuoma arachiforme, tal como fue descrito en Del Prado *et al.* 2007. Los clados Parmeliopsis y Nipponoparmelia presentan el vacuoma heterogéneo.

Cada clado parmelioides estudiado contiene especies con distintas formas de la espora (Fig. 5F). El clado Parmotrema es el más variable, con los cinco tipos de esporas, seguido por el clado Hypotrachyna con cuatro posibles formas de espora. Los clados Parmelina y Melanelia presentan tres formas distintas de esporas. Los clados Xanthoparmelia, Parmeliopsis, Nipponoparmelia y Parmelia presentan esporas de dos distintas formas. Esta variable tampoco presenta ningún patrón a nivel del género.

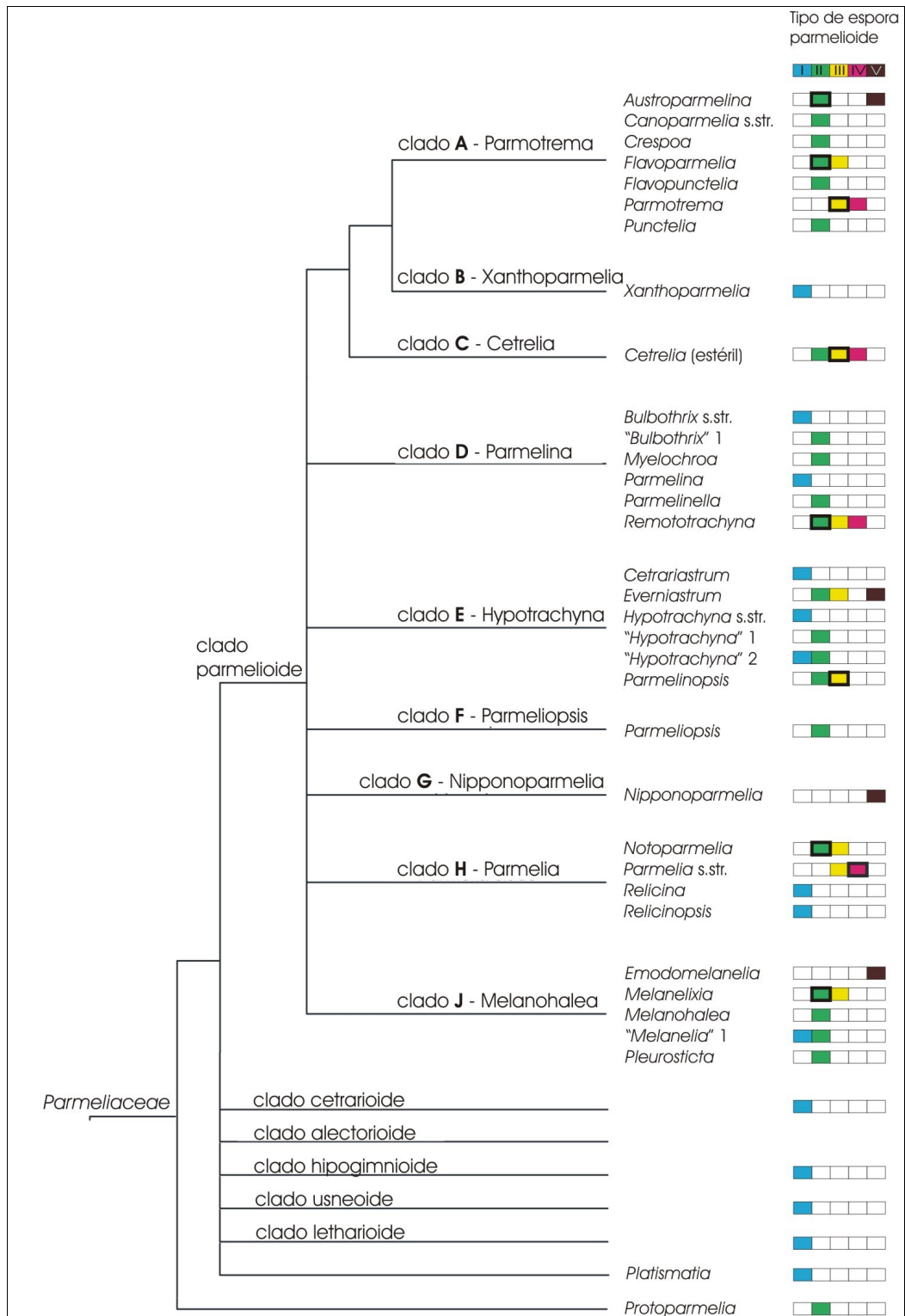


Figura 26 – Distribución de los distintos tipos de esporas en el árbol filogenético basado en 3 genes de la familia *Parmeliaceae*, (Crespo *et al.* 2010b). Los diferentes tipos de esporas parmelioides están representados por cuadrados de colores: tipo I - azul, tipo II - verde, tipo III - amarillo, tipo IV - rojo, tipo V - marrón. El cuadrado con el marco ancho significa que la mayoría de las especies del género presenta este tipo. Los datos del género *Cetrelia* han sido tomados del trabajo sinóptico de Culberson & Culberson (1968).

DISCUSIÓN

Es la primera vez, que se describe la ascosporogénesis en la familia *Parmeliaceae*. El proceso sigue los mismos pasos, que el que fue descrito para otros ascomicetes liquenizados (e.g. Rudolph & Giesy 1966) y no liquenizados (Carroll 1969).

La edad de los especímenes utilizados varia bastante, pero no influye en la composición de las paredes porque una vez terminada la formación de las paredes de las esporas, parece que esas no cambian (Nordin 1997). La diversidad de la ultraestructura de la pared esporal se debe a la variabilidad de un patrón común estructural. Todas las esporas parmeliáceas estudiadas tienen la pared compuesta de cuatro capas. Las diferencias se manifiestan en el grosor de las distintas capas. La pared propia es relativamente constante (100-200 nm) en la mayoría de las especies, lo que indica la importancia de esta capa en el desarrollo de la espora en esta familia. Como apuntó Bellemère (1994), el tamaño de la espora debe estar condicionado por la pared primaria. Después de su formación sólo se añaden las envolturas externas, pero el tamaño de la espora no aumenta (únicamente por el grosor del perisporio).

En algunas esporas es muy difícil diferenciar el endosporio de la pared propia. Esto se debe a que el material depositado en estas dos capas es muy parecido y que las esporas de los parmelioides son hialinas y no marrones como en *Physcia*, donde en la pared propia se depositan los pigmentos y la capa se observa como granulada (Nordin 1997). Nosotros no pudimos observar las esporas germinando, pero se ha señalado que el tubo de germinación se origina a partir del endosporio (Rudolph & Giesy 1966). Por eso esta envoltura se considera como “primordio hifal” (Nordin 1997) y está protegido por las envolturas externas. El endosporio permanece flexible y elástico, capaz de extenderse durante las primeras fases de germinación y capaz de romper las envolturas externas (Nordin 1997).

La capa externa del perisporio es la que presenta mayor variabilidad, desde 50-70 nm en *Parmelina quercina* hasta 900 nm en *Parmelia saxatilis*. Podría ser la capa con mayor capacidad adaptativa a los diferentes ecotipos. Como fue apuntado, representa la capa, que en el microscopio óptico aparece como halo, suponemos que es gelatinosa y es la que protege la espora durante su liberación del asco.

Los resultados muestran que las especies de parmelioides tienen esporas unicelulares, elipsoidales y hialinas. Se ha encontrado la variabilidad en el tamaño y la forma de la espora, en el grosor de la pared esporal, y en el aspecto del vacuoma. Esta variabilidad no corresponde con los clados monofiléticos principales dentro del grupo parmeliode. Algunos

géneros presentan esporas muy homogéneas, de un solo tipo (p.ej. *Xanthoparmelia*, *Parmelina* con esporas de tipo I) mientras que otros presentan esporas de distintos tipos (p.ej. *Everniastrum* con esporas de tipo II, III y V; *Remototrachyna* con esporas de tipo III y IV).

En el clado parmeliode se confirma la fuerte relación ($R^2 = 82,58 \%$, $n = 92$, $p < 0,01$) entre la longitud y la anchura de la espora. Esta relación también se confirma a nivel de la familia, aunque más moderadamente ($R^2 = 80,02 \%$, $n = 107$, $p < 0,01$), debido al valor anómalo de las esporas muy alargadas de *Protoparmelia* ($L/A = 2,57 - 2,97$). También existe cierta relación lineal entre la anchura de la espora y el grosor de la pared aunque la correlación es bastante baja ($R^2 = 53,92 \%$, $n = 92$), por lo que sólo podemos hablar de una tendencia de las esporas estrechas a presentar paredes finas y un aumento del grosor de la pared con la anchura de la espora. Esta tendencia nos ha permitido establecer para los parmelioides cuatro tipos esporales principales (I, II, III, IV), en los que el tamaño de la espora tiene una correlación positiva con el grosor de la pared. Para todos los casos que no siguen esta tendencia se define el grupo V, donde a pesar del gran tamaño de la espora se mantiene la pared fina o mediana (Fig. 6). El resto de las especies parmeliáceas estudiadas encaja en esta tendencia. También se ha observado cierta tendencia de las esporas pequeñas a tener el vacuoma con aspecto arachiforme o reniforme, las esporas medianas a tenerlo de aspecto elíptico con el borde liso, y las esporas grandes y muy grandes a presentarlo de aspecto heterogéneo, formado por muchos vacuomas pequeñitos.

Cada uno de los clados monofiléticos del clado parmeliode, excepto los tres monogénicos (clado B – *Xanthoparmelia*, clado F – *Parmeliopsis*, clado G – *Nipponoparmelia*) presenta tres tipos distintos de esporas. Esto parece significar, que dentro del cada clado se ha producido la evolución de linajes diferentes con prevalencia de un tipo de espora, correspondiendo cada linaje a un género independiente, a un grupo monofilético formado por dos géneros o incluso a un grupo monofilético formado por un género y una pequeña parte de otro género.

Ninguno de los clados principales no monogénicos tiene una característica esporal, sino que en cada clado podemos encontrar casi todos los tipos y formas de las esporas, tipo del vacuoma y grosor de la pared (Fig. 6 y 7). Entre distintos clados se puede observar el paralelismo de la evolución de los caracteres esporales. En el clado *Parmotrema* se produjo la tendencia a desarrollar las esporas medianas hasta grandes con las paredes anchas. Mientras tanto, en el clado *Xanthoparmelia* y *Melanelia*, la tendencia es a tener esporas pequeñas o pequeñas hasta medianas, respectivamente, con las paredes finas.

Tipos de las esporas

El tipo I, esporas pequeñas (longitud $< 10,0 \mu\text{m}$) y con las paredes finas, está restringido a unos pocos géneros del clado parmeliode, como *Xanthoparmelia* (clado B), *Bulbothrix* s.str., *Parmelina* (clado D), *Hypotrachyna* s.str., *Cetrariastrum* (clado E) y *Relicina*, *Relicinopsis* (clado H). Entre todas las especies incluidas en estos géneros, suman más de 1000 especies, que es más de la mitad (60%) de todas las especies del clado parmeliode (aprox. 1800 spp.). En el clado cetrarioide, casi todos los géneros presentan esporas del grupo I (Kärnefelt & Thell 1992; Kärnefelt et al. 1993). Se podría decir, que es el tipo de esporas más común dentro de la familia *Parmeliaceae*.

El tipo II, esporas medianas ($10,0\text{-}15,0 \mu\text{m} \times 5,0\text{-}9,5 \mu\text{m}$), con pared estrecha hasta mediana (400-900 nm) caracteriza a la mayoría de los géneros del clado parmeliode, ya que está presente en 24 de los 32 géneros. No es exclusivo de ningún clado, sino que se presenta en todos ellos excepto en los clados B y G (géneros *Xanthoparmelia* y *Nipponoparmelia*, respectivamente). Algunos géneros son homogéneos, y todas las especies presentan este tipo de las esporas (p.ej. *Melanohalea*, *Punctelia*, *Parmelinella*, etc.). Otros géneros son heterogéneos, y este tipo de esporas es simplemente uno más (p.ej. *Remototrachyna*, *Everniastrum*).

Los tipos III y IV, con esporas grandes y muy grandes ($>15,0 \mu\text{m}$) y con pared ancha hasta muy ancha ($>1 \mu\text{m}$) es característico especialmente de los géneros *Parmotrema* (clado A) y *Parmelia* s.str. (clado H). Esporas con estas características se presentan también en otros géneros con esporas medianas (tipo II), representando una o dos especies del género. Así es el caso de *Flavoparmelia caperata* (clado A), *Cetrelia* (clado C) (Culberson & Culberson 1968), *Remototrachyna adducta* (clado D), *Parmelinopsis horrescens*, *Everniastrum lipidiferum* (clado E), *Notoparmelia crambidiocarpa* (clado H). Estas especies podrían servir como clave en estudios de evolución de los caracteres, representando linajes ancestrales o linajes aislados.

Como excepción a la correlación entre la longitud de la espora y el grosor de su pared, se estableció el tipo V de las esporas, que son las esporas grandes o muy grandes ($>15,0 \mu\text{m}$) pero con la pared fina o mediana ($< 1 \mu\text{m}$). Son muy pocas las especies que se incluyen en este grupo, pero cabe destacar que es el tipo característico de los géneros recién establecidos como *Nipponoparmelia* (clado G) y *Emodomelanelia* (clado J). Se encontraron otras tres especies que tienen esporas tipo V, que pertenecen a los géneros *Flavoparmelia*, *Austroparmelina* (clado A) y *Everniastrum* (clado E).

Aunque en este trabajo no hemos estudiado la estructura de los ascos en detalle ni hemos dado mucha importancia al carácter difícil como el aparato apical, sí que se midió el tamaño de los ascos maduros. Se ha observado una dependencia lineal entre el tamaño de la

espora y el tamaño del asco, especialmente la correlación entre las anchuras de estas dos estructuras es moderadamente fuerte entre los parmelioides ($R^2 = 77,90 \%$, $n = 92$, $p < 0,01$) como en los parmeliáceos ($R^2 = 78,50 \%$, $n = 107$, $p < 0,01$). La correlación entre la longitud de la espora y la anchura del asco es algo más baja pero igual moderadamente fuerte, entre los parmelioides ($R^2 = 75,18 \%$, $n = 92$, $p < 0,01$) como en los parmeliáceos ($R^2 = 76,35 \%$, $n = 107$, $p < 0,01$). Estas medidas nos permitieron relacionar el tipo de la espora con el tipo (forma) del asco según Thell *et al.* 1995. Así las esporas pequeñas del tipo I se puede encontrar en los ascos del tipo Melanelia, las esporas medianas y grandes de los tipos II, III y V en los ascos del tipo Parmelia y las esporas muy grandes del tipo IV se desarrollan en los ascos del tipo Menegazzia. Aunque los tipos ascales no están descritos basándose únicamente en su tamaño sino que prestando mucha atención al aparato apical, nosotros vimos muy complicada la observación y clasificación de este carácter fino y no la hemos empleado.

El estudio de caracteres finos en el clado parmelioides nos permite entender mejor la historia evolutiva de este grupo. Mientras la morfología del talo nos ha permitido hasta ahora agrupar las especies en unos grupos relativamente homogéneos, la anatomía fina desvela, que en cada género (o grupo monofilético supuestamente necesario a formal tal rango taxonómico) existe una o dos especies que se apartan de la característica general del grupo. Estas especies deberían considerarse como especies clave para revelar la historia evolutiva del clado y para el estudio de la evolución de dicho carácter. Podrían constituir un linaje no favorecido o podrían responder a condiciones ambientales específicas y desviantes del resto. Solamente el estudio profundo de cada grupo en relación con grupos hermanos puede dar la respuesta final. Se propone evaluar cada clado monofilético terminal por separado y reconstruir su historia evolutiva.

A los caracteres de los órganos sexuales se les atribuye mayor importancia en el establecimiento de los géneros naturales correspondiendo a los linajes monofiléticos terminales. En este trabajo se estudia el potencial de los caracteres finos y de la ultraestructura de las esporas como un carácter informativo en la taxonomía y filogenia de los parmelioides (**Capítulos II, III, V**). Este trabajo se ha llevado a cabo a la luz de los datos moleculares existentes y de los datos relacionados recogidos de la bibliografía.

El valor de las esporas como carácter taxonómico tiene que ser explorado más y reconsiderarlo a la luz de: (1) los datos adicionales de la ultraestructura en toda la familia y (2) la disponibilidad de datos moleculares aplicados a la filogenia. Aquí se describe la variabilidad y se muestran ejemplos de su utilidad y su valor taxonómico en distintos niveles taxonómicos.

A nivel genérico los caracteres esporales también aportan información de interés en distinto grado. Algunos géneros tienen esporas homogéneas (del mismo tipo, incluso solapándose en tamaño), p.ej. *Xantoparmelia*, *Parmelina*, *Austroparmelina*, que pueden ser utilizados para delimitar el género aunque no sirven para delimitar las especies. Pero existen géneros, donde se incluyen esporas de varios tipos, p.ej. *Remototrachyna*, cuyas especies tienen esporas características que permiten diferenciar algunas especies. Como conclusión, los caracteres de las esporas tienen que ser evaluados individualmente para cada género y no se pueden utilizar los mismos criterios para todos los géneros.

Es de destacar que el valor de los caracteres esporales se ha puesto de manifiesto en algunos géneros en los que la filogenia molecular ya había detectado distintos linajes no relacionados, variabilidad que también se ve reflejada en los caracteres esporales.

El género *Bulbothrix* del clado *Parmelina* (D) es polifilético (Crespo *et al.* 2010b). Apoyándonos en el tamaño de las esporas (Fig. 7), proponemos utilizar éste carácter junto con la distribución geográfica de las especies (Hale 1976) como decisivo para hacer cambios nomenclaturales en este género. Así mantener el *Bulbothrix* s.str. para las especies con distribución sudamericana, rizinas dicotómicas, ácido girofórico (Hale 1976) y con las esporas pequeñas del tipo I e incluir las especies en su mayoría asiáticas con rizinas simples y ácido salazínico de “*Bulbothrix*” 1 en el género *Parmelinella*, con las esporas medianas del tipo II. A pesar de todos los indicios para dividir este género en dos grupos, el cambio nomenclatural se tiene que posponer hasta la obtención de secuencias de ADN de la especie tipo, *B. bicornuta* (Divakar, pers. comm.).

El género *Hypotrachyna* (clado E – *Hypotrachyna*) es polifilético y fue dividido en tres grupos, *Hypotrachyna* s.str., “*Hypotrachyna*” 1 y “*Hypotrachyna*” 2 (Crespo *et al.* 2010b). El grupo “*Hypotrachyna*” 1 forma un grupo monofilético con especies de género *Parmelinopsis*. Apoyándose en el tamaño de la espora y el aspecto del vacuoma de “*H.*” *revoluta* combinado con la filogenia molecular, podemos incluir esta especie en *Parmelinopsis*. Del grupo *Hypotrachyna* s.str. se ha estudiado solo una especie, *H. osseoalba*, que tiene esporas pequeñas del tipo I. Como no se ha podido estudiar más especies de este grande grupo (ca. 156 especies), ni la especie tipo (*H. brasiliiana*) por falta de material, únicamente podemos suponer basándose en Hale (1975), que todas tengan las esporas de tipo I. El tercer grupo, “*Hypotrachyna*” 2 es heterogéneo, con variabilidad entre las tres especies estudiadas pertenecientes al tipo I y II. Como su filogenia tampoco está resuelta del todo (Crespo *et al.* 2010b, Divakar *et al.* 2010) se propone hacer un estudio adicional para poder concluir los cambios taxonómicos.

En el caso del género polifilético *Everniastrum* (clado E – *Hypotrachyna*) que es muy variable en los caracteres finos de la espora, cada una de las tres especies estudiadas tiene

distinto tipo esporal II, III y V. Cabe la posibilidad de que estén incluidos varios linajes y se necesita un estudio que incluya mas especies, tanto morfológico como molecular.

El género *Parmelia* (clado H – *Parmelia*) esta compuesto por tres grupos monofiléticos (Crespo *et al.* 2010). Se trata de 1) el género *Nipponoparmelia*, con las parmeliás asiáticas, que forma un clado individual (clado G – *Nipponoparmelia*); de 2) el género *Notoparmelia*, que reúne las parmeliás australasianas y 3) el grupo monofilético *Parmelia* s.str. (los grupos 2 y 3 pertenecen al clado H – *Parmelia*). El tamaño de las esporas de los tres grupos se solapa, la principal diferencia en las esporas es el grosor de la pared. Mientras las especies de *Nipponoparmelia* tienen esporas del grupo V, esporas grandes con paredes finas hasta medianas, las especies de *Notoparmelia* tiene esporas del tipo II, medianas con pared mediana (excepto *N. crambidiocarpa*, la única especie de las trece de este grupo (Hale 1987) con esporas del tipo III, grandes con pared ancha. Para las esporas de *Parmelia* s.str. es típico el grosor de la pared de más que 1 μm (Hale 1987) y las esporas son de tamaño desde mediano hasta muy grande, del tipo III y IV pero siempre con la pared ancha o muy ancha a diferencia de los grupos monofiléticos anteriores.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la morfología y ultraestructura de las esporas en los miembros de la familia *Parmeliaceae*, especialmente del clado parmelióide. Del trabajo se pueden extraer siguientes conclusiones:

1. El desarrollo de los ascos y de las esporas en familia *Parmeliaceae* es un proceso homólogo a lo de otros ascomicetes ya sean liquenizados o no. La pared esporal está compuesta por tres envolturas, la interna llamada endosporio, la intermedia llamada pared propia y la externa formada a su vez por dos capas, el perisporio. La pared propia es la capa de constante grosor en la mayoría de las especies y el perisporio (siempre doble) es la capa de grosor más variable. Todas las especies del clado parmelióide tienen esporas unicelulares y hialinas.

2. Las esporas varían en tamaño, forma, grosor de la pared y el aspecto del vacuoma. Estos caracteres finos permiten crear cinco tipos de esporas.

3. Los principales clados parmelioides (menos los monogénicos) no pueden estar descritos simplemente por un tipo de esporas, sino que se observa gran variabilidad de las esporas en ellos.

4. Hay que descender a nivel del género (o grupo monofilético compuesto por dos géneros, por parte de un género o por un género en conjunto con la parte de otro género) para poder utilizar las características esporales como carácter diagnóstico.

5. Los caracteres esporales finos son un valor añadido en la diferenciación de subgrupos dentro de géneros basados en la descripción morfológica del talo (p.ej. *Parmelina* vs. *Austroparmelina*; *Parmelia* s.str. vs. *Notoparmelia*; *Bulbothrix* s.str. vs. “*Bulbothrix*” 1; *Hypotrachyna* s.str. vs. “*Hypotrachyna*” 1).

6. Con los caracteres sexuales se confirman varios linajes monofiléticos establecidos en el trabajo de filogenia molecular (Crespo *et al.* 2010b). Así el “*Bulbothrix*” 1 se relaciona con *Parmelinella* y “*Hypotrachyna*” 1 con *Parmelinopsis*. *Notoparmelia* se establece como un género independiente. Se necesita profundizar el estudio de más especies de *Everniastrum* y reconstruir su filogenia con más especies. Lo mismo para el género *Hypotrachyna* y *Canoparmelia*. Aunque *Parmotrema* se presenta como un grupo monofilético, proponemos profundizar detalladamente su estudio, utilizando los caracteres de la spora y los del tipo de excípulo propio (anatomía de la organización de las hifas en la capa inferior de la cúpula y la pigmentación / melanización del anillo apotecial (Crespo *et al.* 2010b).

7. Es necesario llevar al cabo los estudios comparativos para poder entender la variabilidad del carácter. Contrastando los caracteres evaluados con la topología de los árboles filogenéticos moleculares es posible detectar su valor taxonómico en algunos grupos. Este enfoque permite describir los grupos monofiléticos y seguir el rastro de la historia evolutiva de los caracteres importantes en el grupo estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahti, T. (1966) *Parmelia olivacea* and the allied nonisidiate and non-sorediate corticolous lichens in the Northern Hemisphere. *Acta Botanica Fennica* 70: 1–68.
- Amo de Paz, G., Lumbsch, T. H., Cubas, P., Elix, J. A. & Crespo, A. (2010) The morphologically deviating genera *Omphalodiella* and *Placoparmelia* belong to *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae). *Bryologist* 113(2): 376–386.
- Bellemère, A. (1994) Asci and ascospores in Ascomycete systematics. In: D.L.Hawksworth (Ed.), *Ascomycete systematics. Problems and perspectives in the nineties*. Plenum Press, New York.
- Blanco, O., Crespo, A., Elix, J.A., Hawksworth, D.L. & Lumbsch, H.T. (2004a). A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* 53(4): 959–975.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P. K., Esslinger, T. L., Hawksworth, D. L. & Lumbsch, H. T. (2004b) *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *Mycological Research* 108: 873–884.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P.K., Elix, J.A. & Lumbsch, H.T. (2005) Molecular phylogeny of parmotremond lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). *Mycologia* 97(1): 150–159.
- Carroll, G.C. (1969) A study of the fine structure of ascosporeogenesis in *Saccobolus kerverni*. *Archives of Microbiology* 66(4): 321–339.
- Clauzade, G. & Roux, C. (1986) [‘1985’]. Likenoj de Okcidenta Europo. Ilustrita Determinlibro. Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest, Numero Special 7: 1–893.
- Crespo, A., Blanco, O. & Hawksworth, D. L. (2001) The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilising generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* 50: 807–819.
- Crespo, A., Divakar, P.K. & Hawksworth, D.L. (2011) Generic concepts in parmelioid lichens, and the phylogenetic value of characters used in their circumscription. *Lichenologist* 43(6): 511–535.
- Crespo, A., Ferencova, Z., Perez-Ortega, S., Elix, J.A. & Divakar, P.K. (2010a) *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Systematics and Biodiversity* 8(2): 209–221.
- Crespo, A., Gavilán, R., Elix, J. A. & Gutiérrez, G. (1999) A comparison of morphological, chemical and molecular characters in some parmelioid genera. *Lichenologist* 31: 451–460.
- Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P.K., del Prado, R., Perez-Ortega, S., de Paz, G.A., Ferencova, Z., Blanco, O., Roca-Valiente, B., Nunez-Zapata, J., Cubas, P.,

- Argüello, A., Elix, J.A., Esslinger, T.L., Hawksworth, D.L., Millanes, A., Molina, M.C., Wedin, M., Ahti, T., Aptroot, A., Barreno, E., Bungartz, F., Calvelo, S., Candan, M., Cole, M., Ertz, D., Goffinet, B., Lindblom, L., Lücking, R., Lutzoni, F., Mattsson, J.-E., Messuti, M.I., Miadlikowska, J., Piercey-Normore, M., Rico, V.J., Sipman, H.J.M., Schmitt, I., Spribille, T., Thell, A., Thor, G., Upreti, D.K. & Lumbsch, H.T. (2010b) Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59(6), 1735-1753.
- Crespo, A., Lumbsch, H.T., Mattsson, J.-E., Blanco, O., Divakar, P.K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan, P.A. & Wedin, M. 2007. Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 44(2), 812-824.
- Culberson, W.L. & Culberson, C.F. (1968) The lichen genera *Cetrelia* and *Platismatia* (*Parmeliaceae*). *Contribution from the U.S. National Herbarium* 34(7): 449-558.
- Del Prado, R., Ferencova, Z., Armas-Crespo, V., Amo de Paz, G., Cubas, P. & Crespo, A. (2007) The arachiform vacuolar body, an overlooked shared character in the ascospores of a large monophyletic group within *Parmeliaceae* (Xanthoparmelia clade, Lecanorales). *Mycological Research*. 111: 685–692.
- Divakar, P. K. & Upreti, D. K. (2005) *Parmelioid Lichens in India (A Revisionary Study)*. Dehradun: Bishen Singh Mahendra Pal Singh.
- Divakar, P. K., Crespo, A., Blanco, O. & Lumbsch, H.T. (2006) Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical Hypotrachyna clade of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40(2): 448-458.
- Divakar, P. K., Lumbsch, H.T., Ferencova, Z., del Prado, R. & Crespo, A. (2010) *Remototrachyna*, a newly recognized tropical lineage of lichens in the Hypotrachyna clade (*Parmeliaceae*, Ascomycota), originated in the Indian subcontinent. *American Journal of Botany* 97(4): 579-590.
- Elix, J. A. (1993) Progress in generic delimitation of *Parmelia* sensu lato lichens (Ascomycotina: *Parmeliaceae*) and a synoptic key to the *Parmeliaceae*. *Bryologist* 96: 359–383.
- Elix, J. A. (1994) Lichens-Lecanorales 2, *Parmeliaceae*. *Flora of Australia* 55: 1–360.
- Elix, J. A. & Hale, M. E. (1987) *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis* and *Parmotremopsis*, five new genera in the *Parmeliaceae* (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* 31: 491–510.
- Hafellner, J. 1984. Studien in Richtung einer natürlicheren Gliederung der Sammelfamilien Lecanoraceae und Lecideaceae. Beiträge zur Lichenologie. Festschrift J.Poelt. Beiheft zur Nova Hedwigia 79, 241-371.

- Hafellner, J. 1994. Problems in Lecanorales systematics. *In*: Hawksworth, D.L. (Ed.) *Ascomycete Systematics. Problems and Perspectives in the Nineties*, Plenum Press, New York, pp. 315–320.
- Hale, M.E. (1965) A monograph of *Parmelia*, subgenus *Amphigymnia*. *Contributions from the US National Herbarium* 36: 193–358.
- Hale, M. E. (1974) *Bulbothrix*, *Parmelina*, *Relicina*, and *Xanthoparmelia*, four new genera in the *Parmeliaceae* (Lichenes). *Phytologia* 28: 479–490.
- Hale, M.E. (1975) A revision of the lichen genus *Hypotrachyna* (*Parmeliaceae*) in tropical America. *Smithsonian Contributions to Botany* 25: 1–73.
- Hale, M. E. (1976) A monograph of the lichen genus *Bulbothrix* Hale (*Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 32: 1–29.
- Hale, M.E. (1984a) An historical review of the genus concept in lichenology. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 79, 11–23.
- Hale, M. E. (1984b) *Flavopunctelia*, a new genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* 20: 681–682.
- Hale, M. E. (1986a) *Arctoparmelia*, a new genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* 25: 251–254.
- Hale, M. E. (1986b) *Flavoparmelia*, a new genus in the lichen family *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* 25: 603–605.
- Hale, M.E. (1987) A monograph of the lichen genus *Parmelia* Ach. sensu stricto (Ascomycotina: *Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 66: 1–55.
- Hale, M. E. (1988) *Namakwa*, a new lichen genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina: *Parmeliaceae*). *Mycotaxon* 32: 169–174.
- Honegger (1978) The ascus apex in lichenized Fungi I. The *Lecanora*-, *Peltigera*- and *Teloschistes*- types. *Lichenologist* 10(1): 47–67.
- Kärnefelt, E.I., Mattsson, J.-E. & Thell, A. (1993) The lichens genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (*Parmeliaceae*) and their presumed evolutionary affinities. *Bryologist* 96(3): 394–404.
- Kärnefelt, E.I. & Thell, A. (1992) The evaluation of characters in lichenized families, exemplified with the alectoroid and some parmelioid genera. *Plant Systematics and Evolution* 180: 181–204.
- Kärnefelt, E.I. & Thell, A. (1994) Sexual reproductive characters vs. morphological characters in lichen genera. *Journal of Hattori Botanical Laboratory* 76: 207–219.
- Krog, H. & Swinscow, T. D. V. (1981) *Parmelia* subgenus *Amphigymnia* (lichens) in East Africa. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany* 9: 143–231.
- Lumbsch, T.H. & Huhndorf, S.M. 2010. Outline of Ascomycota – 2009. *Myconet* 14, 1–42.
- Massalongo, A. B. (1854) *Neogenea Lichenum*. Verona: Ramanzini.
- Moberg, R. (1977) The lichen genus *Physcia* and allied genera in Fennoscandia. *Symb. Bot. Ups.* 22(1): 1–108.

- Nordin, A. (1996) *Buellia* species (*Physciaceae*) with pluriseptate spores in Norden. *Symb. Bot. Ups.* 31(3): 327-354.
- Nordin, A. (1997) Ascospore characters in *Physciaceae*: an ultrastructural study. *Acta Univ. Ups. Symb. Bot. Ups.* 32 (1): 195-208.
- Poelt, J. & Vezda, A. (1981) Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. Ergänzungsheft II. *Bibliotheca Lichenologica* 16: 1–390.
- Read, N.D. & Beckett, A. (1996) Ascus and ascospore morphogenesis. *Mycological Research* 100 (11): 1281-1314.
- Rudolph, E.D & Giesy, R.M. (1966) Electron microscope studies of lichen reproductive structures in *Physcia aipolia*. *Mycologia* 58(5): 786-796.
- Thell, A., Mattsson, J.-E. & Kärnefelt, I. (1995) Lecanoralean ascus types in the lichenized families *Alectoriaceae* and *Parmeliaceae*. *Cryptogamic Botany* 5(2), 120-127.
- Tibell, L. (1971) The genus *Cyphelium* in Europe. *Svensk. Bot. Tidskr.* 65: 138-164.
- Tibell, L. (1975) The *Caliciales* of boreal North America. *Symb. Bot. Ups.* 21(2): 1-128.
- Tibell, L. (1984) A reappraisal of the taxonomy of *Caliciales*. *Nova Hedwigia* 79: 597-713.

Capítulo III

**The arachiform vacuolar body: an overlooked shared character
in the ascospores of a large monophyletic group within
Parmeliaceae (Xanthoparmelia clade, Lecanorales)**

Publicado en *Mycological Research* 111: 685-692 (2007)

RESUMEN

El cuerpo vacuolar arachiforme: un carácter compartido pasado por alto en las ascosporas de un gran grupo monofilético dentro *Parmeliaceae* (el clado *Xanthoparmelia*, Lecanorales)

Se utilizaron secciones de apotecios para estudiar la morfología interna de las ascosporas del mayor clado monofilético dentro de *Parmeliaceae*, el formado por *Xanthoparmelia* y géneros relacionados. Los resultados se compararon con especies representativas fértiles de la mayoría de los clados parmelioides. Todas las especies de *Xanthoparmelia* tienen esporas pequeñas con la pared fina y con una vacuola única lisa, en forma de cacahuete, con diferentes grados de constricción en el plano ecuatorial. Esto difiere de la vacuola elipsoidal de otros parmelioides. En el clado *Xanthoparmelia*, la reproducción sexual parece mucho más común que en otras parmelioides. Por lo tanto, se sugiere que la presencia de esta singular morfología en las esporas puede haber contribuido al éxito evolutivo de este grupo monofilético. Además, el descubrimiento de este útil carácter de la ascospora demuestra que los estudios morfológicos detallados pueden mejorar significativamente la interpretación de los análisis filogenéticos moleculares. Las características morfológicas de las ascosporas pueden tener más importancia taxonómica en *Parmeliaceae* de lo que se había considerado hasta el momento.



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mycres



The arachiform vacuolar body: an overlooked shared character in the ascospores of a large monophyletic group within *Parmeliaceae* (*Xanthoparmelia* clade, *Lecanorales*)

Ruth DEL PRADO^a, Zuzana FERENCOVÁ^a, Victor ARMAS-CRESPO^b,
Guillermo AMO DE PAZ^a, Paloma CUBAS^a, Ana CRESPO^{a,*}

^aDepartamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

^bDominic Perrault Architecture, 26 Rue Bruneseau, 75013 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2007

Received in revised form

21 March 2007

Accepted 18 April 2007

Published online 29 April 2007

Corresponding Editor:

H. Thorsten Lumbsch

Keywords:

Ascomycota

Character evolution

Reproductive strategies

Spore 3D model

ABSTRACT

Sections of apothecia were used to study the internal morphology of ascospores in the largest monophyletic clade within *Parmeliaceae* composed of *Xanthoparmelia* and related genera. The results were compared with fertile representative species of most other parmelioid clades. All the *Xanthoparmelia* species had spores with a single smooth vacuole, which was peanut-shaped, with different degrees of constriction in the equatorial plane. This differs from the ellipsoid vacuole of other parmelioids. In the *Xanthoparmelia* clade, sexual reproduction seems much more common than in other parmelioids. Thus, we suggest that the presence of this unique spore morphology might contribute to the evolutionary success of this monophyletic group. Further, the discovery of this useful ascospore character demonstrates that detailed ascospore morphological studies significantly enhance molecular phylogenetic analyses. Ascospore features may be more taxonomically significant in *Parmeliaceae* than hitherto considered.

© 2007 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The parmelioid genera comprise around 1500 species (Hale & DePriest 1999), most of them being foliose lichens with rhizines, and form a strongly supported monophyletic group within the *Parmeliaceae* (Blanco *et al.* 2006; Crespo *et al.* 2007), the largest family of lichen-forming fungi. Many of the parmelioid macrolichens do not exhibit ascomata or conidiomata, but instead have diverse asexual reproductive strategies. They develop specialized dual structures, such as soredia or isidia, which disperse fungal and algal partners in a single propagule. The most fundamental characters used

in fungal systematics are sexual characters (ascomatal structure, asci, and ascospores) (McLaughlin *et al.* 2001). As there are few clear differences in those characters, they were not used for the taxonomic studies of parmelioid lichens. Instead, secondary metabolites and morphological characters of the vegetative structures were used (Elix 1993; Elix & Hale 1987; Hale 1984).

Nevertheless, some reproductive characters have been used to segregate some genera in family *Parmeliaceae*, such as the position of the apothecia and the presence of perforated apothecial discs in parmelioid (Elix 1993), and ascus type in cetrarioid group (Kärnefelt *et al.* 1992; Mattsson *et al.* 1992; Thell

* Corresponding author.

E-mail address: acrespo@farm.ucm.es

0953-7562/\$ – see front matter © 2007 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.mycres.2007.04.002

et al. 1995). Further, the structure of the true exciple (amphithecial rim) varies and could also be an important character (Hawksworth 1988; Nash et al. 1990; Randlane et al. 1995). However, in-depth, comparative studies of this character are still lacking.

Ocospore asci and unicellular ellipsoidal hyaline ascospores predominate in members of *Parmeliaceae* that produce ascomata, although there are exceptions such as *Anzia* with multispored asci and crescent-shaped ascospores (Elix 1993), *Alectoria* with brown simple ascospores, *Sulcaria* with brown septate ascospores, and *Oropogon* with brown muriform ascospores (Brodo & Hawksworth 1977). However, systematic studies of the morphology of ascospores in the family are scarce, and there are only a few papers on their ultrastructure (Bellemère 1994; Bellemère & Letrouit-Galinou 1982; Bellemère et al. 1992; Navarro-Rosinés et al. 2001).

Within the parmelioid lichens, *Xanthoparmelia* is the largest genus, and constitutes a strongly supported monophyletic clade including more than 800 species (Blanco et al. 2004, 2005; Crespo et al. 2007; Thell et al. 2004, 2006). Most species of the clade are saxicolous and restricted to perarid, arid, and semiarid Mediterranean climates (as defined by Di Castri 1973) of the Southern Hemisphere (Giordani et al. 2002). In contrast, most other parmelioid groups primarily occur on bark or wood, are distributed in both Hemispheres, and grow mainly in humid or moderately humid regions (including Mediterranean humid and subhumid type of climates). The *Xanthoparmelia* clade is also characterized by a pored epicortex, lack of pseudocyphellae, presence of a structural polysaccharide in the cell wall (xanthoparmelia-type lichenan), and the presence of bifusiform conidia (Blanco et al. 2004; Elix 1993). Most species frequently produce ascomata (63 %, Hale 1990), unlike the majority of other parmelioids.

As a first step to search for possible correlations between the molecular data and ascomatal features, we studied the ascospores of members of the *Xanthoparmelia* clade. To obtain comparative data from other clades, we undertook a comparative study of ascospore variability in other parmelioid lichens. The present study reports the results of our investigations using sections in LM, with complementary digital techniques to present a spatial interpretation of internal ascospore morphology.

Material and methods

Morphological characteristics of the ascospores were studied in the species listed in Table 1. Fertile species were selected from most genera formerly included within the *Xanthoparmelia* clade (Blanco et al. 2004, 2006; Thell et al. 2006). *Chondropsis* (included in *Xanthoparmelia*), and *Omphalodiella* were not investigated due to the lack of fertile specimens. Fertile species from a range of genera from different parmelioid clades (Blanco et al. 2006) were also studied for comparison: *Parmotrema*, *Flavoparmelia*, *Parmelina*, *Hypotrachyna*, *Parmelinopsis*, *Melanohalea*, *Melanelixia*, and *Parmelia*. Vertical sections of apothecia from fresh and herbarium material were made by hand with a razor blade under a dissecting microscope (Leica, Wild M8) at magnification $\times 50$, and with a Slee MTC (Mainz)

freezing microtome. Microtome sections (15 μm thick) were obtained from apothecia hydrated with deionized water for 4 h, included into an embedding medium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound 4583, Zoeterwoude) and frozen at -20°C inside the microtome. Sections were mounted and observed first in water, and then stained with lactophenol cotton blue (Panreac, Barcelona) (unheated).

Additionally, semi-thin sections (0.5 μm) of apothecia from species indicated by an asterisk in Table 1 were prepared. Apothecia were hydrated with distilled water for 24 h, and fixed for 6 h using 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Samples were then cleaned in 0.1 M phosphate buffer, post-fixed in 1 % osmium tetroxide for 2 h, and dehydrated in a graded series of acetone (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, and 100 %). Finally, the samples were embedded in Spurr resin (Spurr Resin Embedding Kit, TAAB S024, Fedelco, Madrid). Sections were cut on a Reichert-Jung (Leica) Ultracut-E Ultramicrotome (Ontario) and stained with toluidine blue (Panreac, Barcelona).

Sections obtained by both methods were observed and photographed under LM (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Badhoevedrop, Netherlands) using Nomarski differential interference contrast optics for microtome sections and regular light microscopy for the semi-thin sections.

To visualize the internal structure of the ascospores, we built diagrammatic three-dimensional (3D) models using Auto Cad (Auto Cad®2005; Autodesk) and 3D-Studio Max (Autodesk®3 ds Max®9 3D animation; Autodesk) to model and rotate the spore images.

Results

Microtome sections (15 μm) from apothecia of *Xanthoparmelia*, *Paraparmelia*, *Neofuscelia*, *Xanthomaculina*, and *Namakwa* (currently all merged in *Xanthoparmelia*), showed different ascospore vacuole morphologies from two separate circular bodies (Fig 1A–C), to elliptical and more or less constricted in the middle (Fig 1D–E; arrows); this was especially apparent using Nomarski optics. Lateral median sections (Fig 1F), and semi-thin sections (0.5 μm ; Fig 1G–H) show the inner contents as a single smooth vacuole with a constriction and overall a peanut (arachiform) shape (Fig 1F). It should be noted that the apparent variability of the ascospore vacuoles is an artefact resulting from different orientations and focus levels in the optical section. In *Xanthoparmelia*, longitudinal (median) sections in frontal view show two bodies within the spore, either separated (Fig 1H; arrows) or connected in the middle (Fig 1G; arrow). In the first case the two bodies are sections of both extremes of the peanut shape, whereas in the second, the two bodies appear connected because the section goes through the median plane of the vacuole. The vacuoles also vary in the degree of constriction at the equator of the ascospore. Longitudinal sections in lateral view clearly show the arachiform shape of the vacuole (Fig 1F). In transverse (cross) section, the spores show one internal body (Fig 1A–D, G–H), corresponding to sections made within one of the two swollen apical parts of the vacuole. Fig 1G–H also shows that there is protoplasm outside the vacuole and not wall tissue outgrowths. This morphology

Table 1 – Specimens used for the morphological study of the ascospores of *Xanthoparmelia* and representatives of other parmelioid clades (after Blanco et al. 2006)

Species	Herbarium accession no.	Locality	Collector (s), date of collection	Parmelioid clade
<i>Bulbothrix coronata</i>	MAF 13987	SOUTH AFRICA, Western Cape	Crespo et al., Jun. 2005	<i>Hypotrachyna</i>
<i>Canoparmelia pruinata</i>	MAF 14270	AUSTRALIA, Western Australia	Elix, Jun. 2003	<i>Parmotrema</i>
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	MAF 7465	COSTA RICA, San José	Trest, Jul. 2000	<i>Hypotrachyna</i>
<i>Flavoparmelia caperata</i> *	MAF 10364	SPAIN, Cadiz	Crespo et al., Jan. 2002	<i>Parmotrema</i>
<i>Flavopunctelia flaventior</i> *	MAF 6531	USA, California	Nash, Jun. 1991	<i>Parmotrema</i>
<i>Hypotrachyna adducta</i> *	MAF 10206	CHINA, Yunnan	Crespo et al., Oct. 2002	<i>Hypotrachyna</i>
<i>H. revoluta</i> *	MAF 13989	SOUTH AFRICA, Western Cape	Crespo et al., May 2005	<i>Hypotrachyna</i>
<i>Karoowia adhaerens</i>	BM 000676682	SOUTH AFRICA, Pretoria	Brusse, Jan. 1989	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>K. adligans</i>	BM 000763101	SOUTH AFRICA, Pretoria	Brusse, Jan. 1989	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>K. insipida</i>	BM 000763089	SOUTH AFRICA, Pretoria	Brusse, Jan. 1989	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>Melanelixia glabra</i> *	MAF 7634	SPAIN, Salamanca	Hawksworth, Jan. 2001	<i>Melanelixia</i>
	MAF 14276	SPAIN, Caceres	Crespo et al., Jun. 2002	
<i>Melanohalea exasperata</i> *	MAF 7636	SPAIN, Cadiz	Crespo et al., Jan. 2002	<i>Melanohalea</i>
	MAF 10214	SPAIN, Guadalajara	Blanco, Sep. 2003	
<i>Myelochroa irrugans</i>	MAF 10207	CHINA, Yunnan	Crespo et al., Oct. 2002	<i>Parmelina</i>
<i>Parmelia saxatilis</i> *	MAF 11541	SPAIN, Cadiz	Crespo et al., Jan. 2002	<i>Parmelia</i>
	MAF 12518	SPAIN, La Rioja	Argüello, Sep. 2004	
<i>Parmelina quercina</i> *	MAF 13949	SPAIN, Madrid	Crespo et al., Apr. 2003	<i>Parmelina</i>
<i>P. endoleuca</i>	Elix 28247	AUSTRALIA, Canberra Nature Park	Elix, Nov. 2003	<i>Parmelina</i>
<i>P. pseudorelicina</i>	Elix 28816	AUSTRALIA, Canberra Nature Park	Elix, May 2005	<i>Parmelina</i>
<i>Parmelinopsis subfaticens</i> *	MAF 10677	AUSTRALIA, Morton National Park	Molina & Elix, Oct. 1999	<i>Hypotrachyna</i>
<i>Parmotrema nilgherrense</i> *	MAF 14292	CONGO, Khuzi National Park	Manush, Jul. 2005	<i>Parmotrema</i>
<i>Punctelia flaventior</i>	MAF 5344	USA, Hawaii	Weber, Mar. 1983	<i>Parmotrema</i>
<i>P. subflava</i>	MAF 7623	AUSTRALIA, Melville Point	Molina & Elix, Oct. 1999	<i>Parmotrema</i>
<i>Xanthoparmelia angustiphylla</i>	MAF 6768	USA, Illinois	Nash, Jul. 1999	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. azaniensis</i> (syn. <i>Almbornia azaniensis</i>)	MAF 14269	SOUTH AFRICA, Western Cape	Crespo et al., Jun. 2005	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. conspersa</i> *	MAF 6793	SPAIN, Zamora	Crespo et al., Sep. 1998	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. exornata</i> (syn. <i>Namakwa exornata</i>)	MAF 14290	SOUTH AFRICA, Western Cape	Crespo et al., Jun. 2005	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. glabrans</i> (syn. <i>Neofuscelia glabrans</i>)	MAF 9912	SPAIN, Zaragoza	Blanco, Jun. 2003	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. hottentotta</i> (syn. <i>Xanthomaculina hottentotta</i>)	MAF 14291	SOUTH AFRICA, Western Cape	Crespo et al., Jun. 2005	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. lineola</i>	MAF 9955	USA, Arizona	Barreno et al., Mar. 2001	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. lithophila</i> (syn. <i>Paraparmelia lithophila</i>)	MAF 6900	AUSTRALIA, New South Wales	Molina & Elix, Sep. 1999	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. ovealmbornii</i> (syn. <i>Almbornia cafferensis</i>)	MAF 14268	SOUTH AFRICA, Western Cape	Crespo et al., Jun. 2005	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. pulla</i> (syn. <i>Neofuscelia pulla</i>)	MAF 7081	SPAIN, Salamanca	Crespo et al., Nov. 2000	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. pulloides</i> (syn. <i>Neofuscelia pulloides</i>)	MAF 6784	SPAIN, Zamora	Crespo et al., Sep. 1998	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. subincerta</i> * (syn. <i>Neofuscelia subincerta</i>)	MAF 7494	AUSTRALIA, Molonglo Gorge Reserve	Molina & Elix, Sep. 1999	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. sublaevis</i>	MAF 7460	SPAIN, Tenerife	Crespo et al., Oct. 2000	<i>Xanthoparmelia</i>
<i>X. subspodochroa</i>	MAF 7463	AUSTRALIA, New South Wales	Molina & Elix, Sep. 1999	<i>Xanthoparmelia</i>
(syn. <i>Paraparmelia subspodochroa</i>)				

Microtome sections (15 µm) were obtained from all species, and thinner sections (semi-thin, 0.5 µm) were obtained from species marked by an asterisk. Species previously ascribed to the genera *Paraparmelia*, *Neofuscelia*, *Xanthomaculina*, *Almbornia* and *Namakwa* (included within *Xanthoparmelia* by Blanco et al. 2004 and Thell et al. 2006) are also indicated.

was seen in the ascospores of all of *Xanthoparmelia* specimens studied (Table 1; Fig 1), and in both young spores still inside the ascus and mature ones outside the ascus. In species formerly included in *Almbornia* and in the related genus *Karoowia* p. p. (Table 1), many of the spores have a similar arachiform morphology, but with some variability in the shape and number of vacuolar constrictions.

Representative examples of ascospores in other genera of parmelioid lichens are shown in Fig 2: *Parmelia saxatilis* (Fig 2A; *Parmelia* clade), *Parmotrema nilgherrense* (Fig 2B; *Parmotrema* clade), *Parmelina quercina* (Fig 2C; *Parmelina* clade), *Xanthoparmelia conspersa* (Fig 2D; *Xanthoparmelia* clade), *Melanohalea exasperata* (Fig 2E; *Melanohalea* clade) and *Hypotrachyna revoluta* (Fig 2F; *Hypotrachyna* clade). Sections of 0.5 µm of fertile species of the *Melanelixia* clade have also been investigated (Table 1, data not shown) with similar

results. The optical microscope observations confirm that the ascospores of other parmelioid clades have ellipsoid and not arachiform vacuoles.

The diagrammatic 3D model (Fig 3) based on microscope images at different orientations depicts our interpretation of the vacuole shape in the ascospores of *Xanthoparmelia*. The range of variation in the degree of constriction at the equatorial level as seen in different specimens is shown in images I–IV, with the most frequent morphologies being represented by images II and III.

Discussion

The parmelioid lichens (Crespo et al. 2007) are conspicuous and widespread, mostly macrolichens with complex and

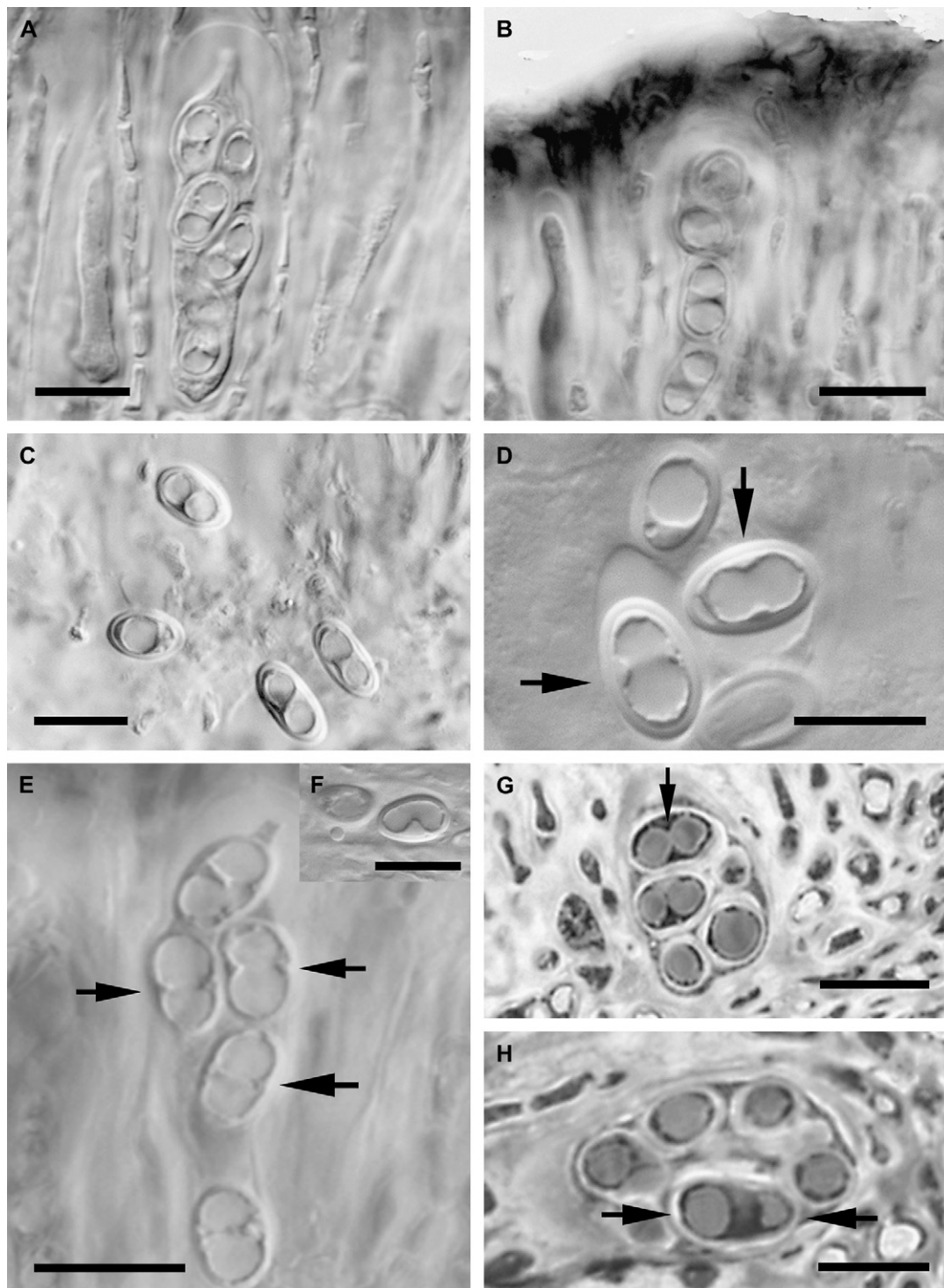


Fig 1 – Microtome sections (15 µm) of apothecia from species included in the *Xanthoparmelia* clade. (A) *Xanthoparmelia conspersa* (MAF 6793); (B) *X. litophila* (MAF 6900); (C) *X. pulla* (MAF 7081); (D) *X. hottentota* (MAF 14291); (E) *X. exornata* (MAF 14290); (F) *X. exornata* (MAF 14290); Arrows show spores with different degrees of constriction in the middle of the internal vacuole. (G–H) semi-thin sections (0.5 µm) of asci with included ascospores from *Xanthoparmelia conspersa* (MAF 6793); the arrow in (G) indicates a longitudinal section of the spore in frontal view with the vacuole comprising two bodies connected in the middle; the arrows in (H) indicate a longitudinal section of the spore in frontal view, with the vacuole constituted by two separate bodies. See in [Table 1](#) the actual collections from which the photos were taken. Bar = 10 µm.

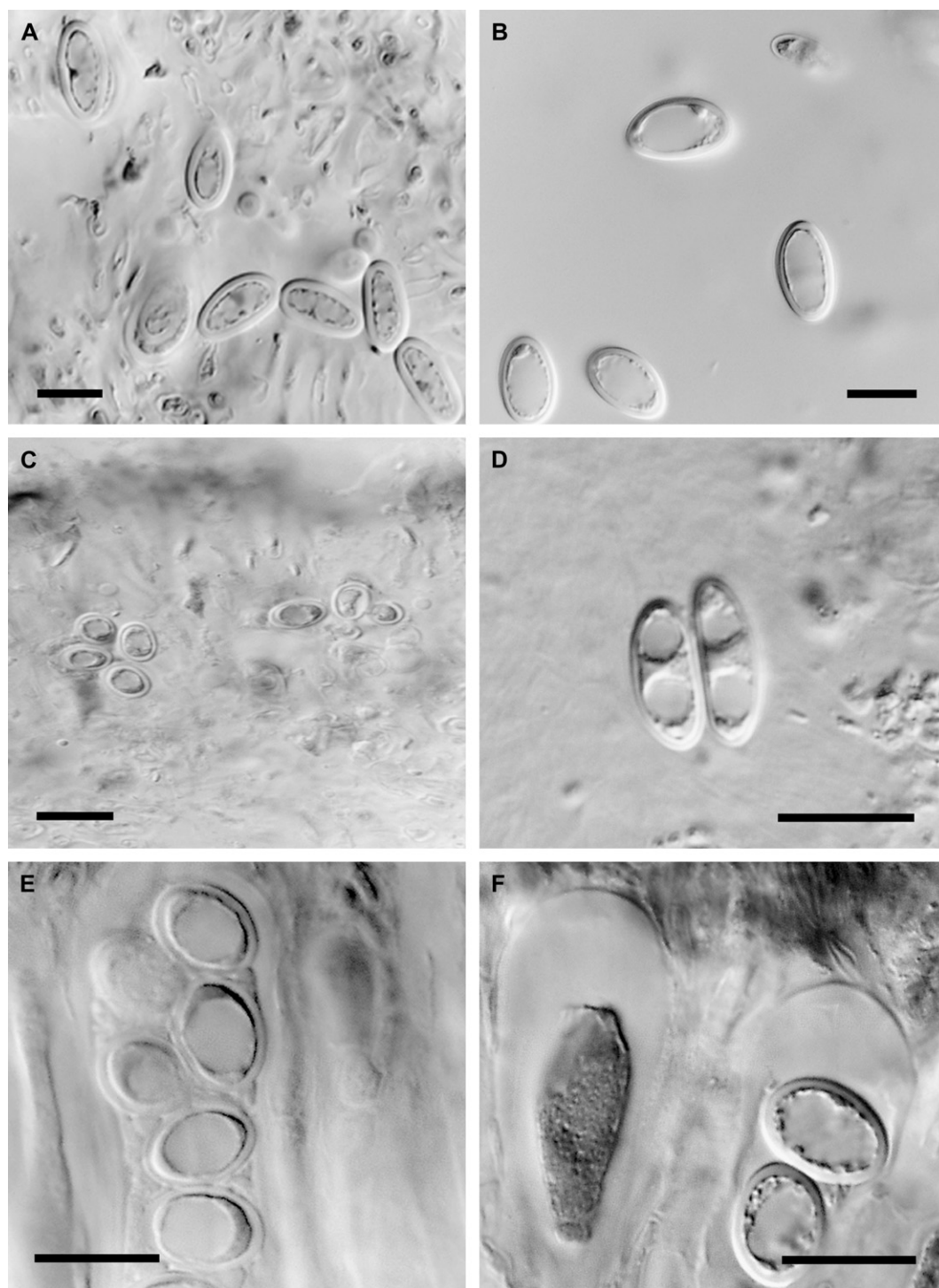


Fig 2 – Microtome sections (15 μm) of apothecia from species belonging to different parmelioid clades: (A) *Parmelia saxatilis* (MAF 12518); (B) *Parmotrema nilgherrense* (MAF 14292); (C) *Parmelina quercina* (MAF 13949); (D) *Xanthoparmelia conspersa* (MAF 6793); (E) *Melanohalea exasperata* (MAF 10214); and (F) *Hypotrachyna revoluta* (MAF 13989). See in [Table 1](#) the actual collections from which the photos were taken. Bar = 10 μm .

well-developed thalli. Because of frequently lacking ascomata and/or lacking of obvious differences in ascomatal characters, morphological and chemical characters are routinely used for identification. Moreover, several authors have argued that the main evolutionary trends in *Parmeliaceae* have been in the morphology and anatomy of the

thallus rather than in the ascomata, as is assumed to be the case in crustose lichens ([Hale 1981](#); [Elix 1993](#)). For example, the presence of pseudocyphellae or pores in the epicortex was used to suggest evolutionary lines in *Parmeliaceae* by [Hale \(1981\)](#). However, in spite of the relevance of most of these characters at species level,

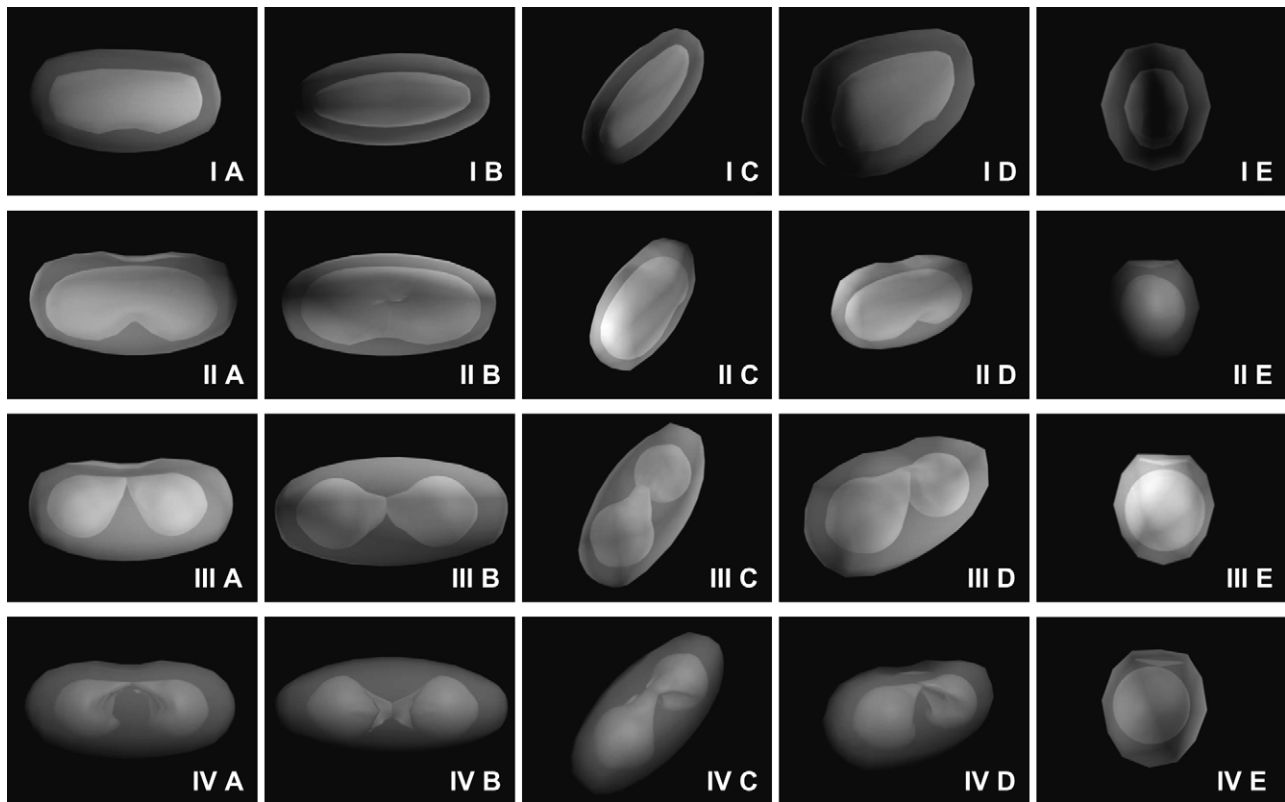


Fig 3 – Diagrammatic 3D model of the vacuole shape at different orientations in spores of *Xanthoparmelia* (based on *X. conspersa*). Series: (A) longitudinal sections in lateral view; (B) longitudinal sections in frontal view; (C–D) ascospores at different rotational angles; and (E) transverse sections in polar views. Variation in the degree of constriction at the equatorial level as seen in different specimens is shown in Figs I–IV.

molecular phylogenetic studies indicate that their taxonomic value has been overestimated at higher classification levels within the *Parmeliaceae*. Phylogenetic trees based on DNA sequences indicate that many morphological characters have been gained and lost multiple times during the family diversification (Blanco et al. 2006; Divakar et al. 2006; Crespo et al. 2007).

Although ascomatal characters other than the occurrence of hyaline simple versus brown-simple, brown-septate, and brown-muriform ascospores (see above) have rarely been employed in *Parmeliaceae*, a few early cladistic studies explored the asci and interascal filaments (Kärnefelt et al. 1992; Mattsson et al. 1992; Mattsson & Wedin 1998; Thell et al. 1995) and showed that they were taxonomically useful for some generic delimitations, especially amongst the cetrarioid members.

Ascospores have been widely used as a systematic character in lichens from the classic contribution of Jatta (1899) to the present. Several studies have been published in different genera or families focusing on the ultrastructure of the spores (Mayrhofer 1982; Nordin 1997; Poelt & Mayrhofer 1979), but also on the ornamentation of the spore walls (Mayrhofer et al. 1992; Nordin 1997; Scheidegger 1993; Thomson & Thomson 1984; Tibell 1981). These features of the ascospores have been stated to be good characters to differentiate taxa at lower taxonomic levels (genera and species) in the ascomycetes (Bellemère 1994).

The spores of parmelioid lichens have been broadly defined as unicellular, hyaline, and ellipsoid, lacking features that could be used as diagnostic characters. However, our studies indicate that there is variability in several morphological characters of the spores, including size and form, thickness of the external layer of the spore wall, and morphology of the vacuole.

We found that all the *Xanthoparmelia* species studied had ascospores with a similar internal morphology. The ascospores have a single, smoothly rounded vacuole, which appears peanut-shaped (arachiform) because of a constriction in the equatorial plane. The degree of the constriction varies, and in the most extreme cases there is only a narrow isthmus connecting two almost separate ovoid or spherical bodies. Spores of *Xanthomaculina* and *Namakwa* (now included in *Xanthoparmelia*) showed similar morphology, as do *Almbornia* and *Karoowia*, although the latter exhibits some variability in vacuolar shape. The small overall size of the ascospores, smaller than in any other parmelioid genus ($6\text{--}10 \times 4\text{--}6 \mu\text{m}$; Elix 1993), made it difficult to appreciate the shape of the vacuolar body inside the ascospore. However, 3D interpretation of the microscopic images facilitated the visualization of the vacuole from different orientations. Our results indicate that the morphology of the ascospore is a homogeneous character in *Xanthoparmelia* itself, and seems to be a shared character in this monophyletic group. Additional studies are currently

ongoing in other *Karoowia* and related genera to corroborate that this character is a diagnostic feature for the whole *Xanthoparmelia* clade. In order to facilitate future discussion about this ascospore-type, we propose that they be referred to as arachiform.

In other parmelioid genera the elliptical and large vacuole occupies the majority of the internal cell volume. Contrarily, the proportion of protoplasm : vacuolar volume in *Xanthoparmelia* is larger than in any other parmelioid genus as a consequence of the shape of the vacuole.

The widespread occurrence of arachiform ascospores in such an evolutionarily successful clade as the *Xanthoparmelia* is unlikely to be serendipitous. Indeed, it is tempting to speculate that this kind of vacuole might convey some adaptive advantage. *Xanthoparmelia* s. lat. species constitute a highly diversified monophyletic group, with more than 800 species, making it the largest genus within *Parmeliaceae*, and perhaps even within *Lecanorales*. These lichens grow preferentially on eutrophic rocks in harsh environments (dry or extremely arid, not perhumid, humid, or subhumid). Only a small number of *Xanthoparmelia* species have been found growing on other substrates (lignin or soil) or in humid environments (e.g. over 60 species in Tasmania; J. A. Elix personal communication). *Xanthoparmelia* also has a higher percentage of species that produce ascomata than any other parmelioid group. Hale (1990) estimated that more than 50 % of the species develop apothecia and do not form isidia. Thus, sexual reproduction seems much more important in this group than in most other groups of parmelioid lichens. We can not exclude the possibility that the morphology of the vacuole in *Xanthoparmelia* is part of a degenerative process, but doubt this is the case in view of its constancy and presence in freshly collected material. Germination tests on freshly discharged arachiform ascospores could be used to test this last hypothesis, but was beyond the scope of this present investigation.

Although some comparative studies including rates of spore germination encompassing other monophyletic branches within *Parmeliaceae* are needed, two conclusions of our study should be highlighted: (1) the role of this unique type of ascospore in the light of the evolutionary success of this large group of lichens deserves to be investigated further; and (2) detailed ascospore studies combined with ongoing molecular evolutionary studies could reveal taxonomically significant characters in *Parmeliaceae*, as in other groups of fungi, and might provide new insights into the asexual and sexual reproductive strategies of this group of lichens.

Acknowledgements

We thank Oscar Blanco, Pradeep K. Divakar, Jack A. Elix, Leopoldo G. Sancho and David L. Hawksworth for helpful comments on the manuscript. Financial support has been granted by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2004-1848/BOS) and by the Universidad Complutense de Madrid (Infraestructuras para grupos de investigación to SYSTEMOL). Semi-thin sections were obtained in the Luis Bru Microscopy Centre at the Universidad Complutense de Madrid.

REFERENCES

- Bellemère A, 1994. Asci and ascospores in ascomycete systematics. In: Hawksworth DL (ed), *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. Plenum Press, New York.
- Bellemère A, Letrouit-Galinou MA, 1982. Le développement des asques et des ascospores chez le *Caloplaca marina* Wedd. et chez quelques lichens de la famille des Teloschistaceae (*Caloplaca*, *Fulgensia*, *Xanthoria*): étude ultrastructurale. *Cryptogamie, Bryologie et Lichenologie* 3: 95–137.
- Bellemère A, Janex-Favre MC, Melendez-Howell LM, Parguey-Leduc A, 1992. Diversité ultrastructurale de la paroi ascosporale chez quelques Eupyrénomycètes. *Cryptogamie, Mycologie* 13: 215–246.
- Blanco O, Crespo A, Elix JA, Hawksworth DL, Lumbsch HT, 2004. A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (*Ascomycota*; *Lecanorales*). *Taxon* 53: 959–975.
- Blanco O, Crespo A, Elix JA, 2005. Two new species of *Xanthoparmelia* (*Ascomycota*: *Parmeliaceae*) from Spain. *Lichenologist* 37: 97–100.
- Blanco O, Crespo A, Ree RH, Lumbsch HT, 2006. Major clades of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 52–69.
- Brodo IM, Hawksworth DL, 1977. *Alectoria* and allied genera in North America. *Opera Botanica* 42: 1–164.
- Crespo A, Lumbsch HT, Mattsson J-E, Blanco O, Divakar PK, Articus K, Wiklund E, Bawingan PA, Wedin M, 2007. Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (*Ascomycota*) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, doi:10.1016/j.ympev.2006.11.029.
- Di Castri F, 1973. Climatographical comparisons between Chile and the western coast of North America. In: Di Castri F, Mooney HA (eds), *Mediterranean Type Ecosystems, Origin and Structure*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 21–36.
- Divakar PK, Crespo A, Blanco O, Lumbsch HT, 2006. Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical *Hypotrachyna* clade of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 448–458.
- Elix JA, 1993. Progress in the generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (*Ascomycotina*: *Parmeliaceae*) and a synoptic key to the *Parmeliaceae*. *Bryologist* 96: 359–383.
- Elix JA, Hale Jr ME, 1987. *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis* and *Parmotremopsis*, five new genera in the *Parmeliaceae* (lichenized *Ascomycotina*). *Mycotaxon* 29: 233–244.
- Giordani P, Nicora P, Rellini I, Brunialti G, Elix JA, 2002. The lichen genus *Xanthoparmelia* (*Ascomycotina*, *Parmeliaceae*) in Italy. *Lichenologist* 34: 189–198.
- Hale Jr ME, 1981. Pseudocyphellae and pored epicortex in the *Parmeliaceae*: their delimitation and evolutionary significance. *Lichenologist* 13: 1–10.
- Hale Jr ME, 1984. New species of *Xanthoparmelia* (Vain.) Hale (*Ascomycotina*: *Parmeliaceae*). *Mycotaxon* 20: 73–79.
- Hale Jr ME, 1990. A synopsis of the lichen genus *Xanthoparmelia* (Vainio) Hale (*Ascomycotina*, *Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 74: 1–250.
- Hale BW, DePriest PT, 1999. Mason E. Hale's list of epithets in the parmelioid genera. *Bryologist* 102: 462–544.
- Hawksworth DL, 1988. [Review of:] J.A. Elix, J. Johnston & P.M. Armstrong: a revision of the lichen genus *Xanthoparmelia* in Australasia. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany* 15: 163–362. *Lichenologist* 20: 302–303.
- Jatta A, 1899. Qualche osservazione sulle spore dei licheni e sull'importanza dei loro caratteri nella determinazione dei generi. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* 6: 493–515.

- Kärnefelt I, Mattsson J-E, Thell A, 1992. Evolution and phylogeny of cetrarioid lichens. *Plant Systematics and Evolution* **183**: 113–160.
- Mattsson J-E, Thell A, Kärnefelt I, 1992. A proposed segregation of the genus *Cetraria* sensu lato into presumed monophyletic groups based on strict mycological characters. In: Kärnefelt I (ed), *International Association for Lichenology Symposium 2*, Abstract Volume, p. 16. Lund.
- Mattsson J-E, Wedin M, 1998. Phylogeny of the *Parmeliaceae*—DNA data versus morphological data. *Lichenologist* **30**: 463–472.
- Mayrhofer H, 1982. Ascosporen und evolution der flechtenfamilie *Physciaceae*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **52**: 313–321.
- Mayrhofer H, Sheard JW, Matzer M, 1992. *Mobergia* (*Physciaceae*, lichenized ascomycetes), a new genus endemic to western North America. *Bryologist* **95**: 436–442.
- McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds), 2001. *The Mycota*, Vol. VII. Parts A–B. *Systematics and Evolution*, Springer-Verlag, Berlin.
- Nash III TH, Hafellner J, Common RS, 1990. *Omphalora*, a new genus in the *Parmeliaceae*. *Lichenologist* **22**: 355–365.
- Navarro-Rosinés P, Roux C, Bellemere A, 2001. Ultrastructure de *Weddellomyces epicallopusma* (*Dothideales*, *Dacampiaceae*, *Ascomycota*), plus particulièrement de ses ascospores. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences* **324**: 443–451.
- Nordin A, 1997. Ascospore characters in *Physciaceae*: an ultra-structural study. *Symbolae Botanicae Upsalienses* **32** (1): 195–208.
- Poelt J, Mayrhofer H, 1979. Studien über ascosporen-typen der flechtengattung *Rinodina*. *Beihefte zur Sydowia* **8**: 312–331.
- Randlane T, Thell A, Saag A, 1995. New data about the genera *Cetrariopsis*, *Cetrelia* and *Nephromopsis* (fam. *Parmeliaceae*, lichenized *Ascomycotina*). *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* **16**: 35–60.
- Scheidegger C, 1993. A revision of European saxicolous species of the genus *Buellia* de Not. and formerly included genera. *Lichenologist* **25**: 315–364.
- Thell A, Mattsson J-E, Kärnefelt I, 1995. Lecanoralean ascus types in the lichenized families *Alectoriaceae* and *Parmeliaceae*. *Cryptogamic Botany* **5**: 120–127.
- Thell A, Feuerer T, Kärnefelt I, Myllys L, Stenroos S, 2004. Monophyletic groups within the *Parmeliaceae* identified by ITS rDNA, b-tubulin and GAPDH sequences. *Mycological Progress* **3**: 297–314.
- Thell A, Feuerer T, Elix JA, Kärnefelt I, 2006. A contribution to the phylogeny and taxonomy of *Xanthoparmelia* (*Ascomycota*, *Parmeliaceae*). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **100**: 797–807.
- Thomson NF, Thomson JW, 1984. Spore ornamentation in the lichen genus *Solorina*. *Bryologist* **87**: 151–153.
- Tibell L, 1981. Formation of spore ornamentation in two *Sphaerophorus* species. *Nordic Journal of Botany* **1**: 333–340.

Capítulo IV

***Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota)**

Publicado en *Systematics and Biodiversity* 8(2): 209–221 (2010)

RESUMEN

***Austroparmelina*, un nuevo linaje de Australasia en los líquenes parmelioides (Parmeliaceae, Ascomycota)**

Los líquenes parmelioides forman el mayor grupo monofilético dentro de Parmeliaceae, una familia de distribución mundial. El género *Parmelia* fue descrito por Hale (1976a) incluyendo especies de ambos hemisferios. Hemos empleado análisis de parsimonia, bayesiano y de máxima verosimilitud para estudiar un conjunto combinado de datos de secuencias de rDNA de ITS y LSU nucleares y SSU mitocondrial para: (1) poner a prueba la monofilia de *Parmelina* y (2) aclarar el estatus del género y la posición filogenética de las especies de Australasia. Se han generado veintiuna secuencias nuevas para este estudio. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que *Parmelina* es un género polifilético y que las especies forman dos grandes grupos bien apoyados (Grupos I y II). Las especies de *Parmelina* de Australasia y dos especies de *Canoparmelia* (*C. pruinata* y *C. macrospora*) forman el grupo I, que está anidado dentro de los géneros parmotremaes de Parmeliaceae; las especies de *Parmelina* del hemisferio norte occidental, incluidas las de América del Norte y la cuenca mediterránea, forman un grupo monofilético (Grupo II) que es hermano del género *Myelochroa* de la zona oriental templada de Asia. Las características morfológicas y químicas se han revaluado teniendo en cuenta la filogenia observada. Algunos de los rasgos morfológicos, como la morfología del lóbulo, varios caracteres del excípulo y la distribución geográfica son útiles para caracterizar el linaje monofilético formado por las especies de *Parmelina/Canoparmelina* de Australasia. Este linaje se describe como nuevo género *Austroparmelina*. Se proponen trece nuevas combinaciones en este nuevo género.

Research Article

Austroparmelina, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota)

ANA CRESPO¹, ZUZANA FERENCOVA¹, SERGIO PÉREZ-ORTEGA¹, JOHN A. ELIX² & PRADEEP K. DIVAKAR¹

¹Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

²Research School of Chemistry, Building 33, Australian National University, Canberra, ACT 0200, Australia

(Received 16 June 2009; revised 12 November 2009; accepted 1 March 2010)

Parmelioid lichens form the largest monophyletic group within the Parmeliaceae, a family distributed worldwide. The genus *Parmelina* was described by Hale (1976a) accommodating species from both hemispheres. We have employed parsimony, Bayesian and maximum likelihood analyses of a combined data set of nu ITS, LSU and mt SSU rDNA sequences to (1) test the monophyly of *Parmelina* and (2) to elucidate the generic status and phylogenetic position of the Australasian species. Twenty-one new sequences were generated in this study. Our results provide evidence that *Parmelina* is polyphyletic and the species fall into two major well-supported groups (Groups I and II). The Australasian species of *Parmelina* and two species of *Canoparmelia* (*C. pruinata* and *C. macrospora*) form Group I, which is nested within the parmotrema genera of Parmeliaceae, *Parmelina* species from the northern hemisphere including those from western North America and the Mediterranean basin form a monophyletic group (Group II), which is sister to the East Asian temperate genus *Myelochroa*. Morphological and chemical features were reevaluated considering this observed phylogeny. Some morphological features like lobe morphology, several traits in the excipulum and geography are useful in characterizing the monophyletic lineage of the Australasian *Parmelina/Canoparmelia* species. This lineage is described as the new genus *Austroparmelina*. Thirteen new combinations in the new genus are proposed.

Key words: Ascomycota, *Austroparmelina*, cryptic variation, excipulum as a taxonomic character, ITS, molecular phylogeny, mt SSU, multiple loci, new genus, nu LSU, Parmeliaceae

Introduction

Traditionally, the generic segregation of lichenized fungi was based on morphological, anatomical and chemical characters, and in the last three decades a number of genera were described in *Parmeliaceae* using these features (Hale, 1974, 1976a, 1976b, 1984, 1986; Sipman, 1980, 1986; Culberson & Culberson, 1981; Krog, 1982; Elix *et al.*, 1986; Elix & Hale, 1987; Kurokawa, 1991; Elix, 1993). However, more recently the taxonomic re-evaluation of these genera has been forthcoming based mainly on molecular phylogenies (Blanco *et al.*, 2004a, 2005; Mattsson *et al.*, 2004; Divakar *et al.*, 2006; Thell *et al.*, 2006; Wirtz *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2007). In some cases, these studies revealed previously undetected morphological characters of phylogenetic or taxonomic significance (e.g. in *Xanthoparmelia*, *Parmotrema*, *Usnea*). Similarly, *Melanelixia* and *Melanohalea* were segregate from *Melanelia* s. lat., using both molecular and morphological data (Blanco *et al.*, 2004b).

Parmelina, including 15 species (Crespo *et al.*, 2007), is a widespread genus mainly growing in low to moderate altitudes, in moderate oceanic climates (Rivas-Martínez, <http://www.ucm.es/info/cif/data/index.htm>) especially in areas with a Mediterranean climate; it has two centres of speciation (Elix, 1993), one in Eurasia and northwest Africa and the other in Australasia. The genus was segregated from *Parmelia* s. lat. by Hale (1974) [with *P. tiliacea* (Hoffm.) Hale, a species from Europe and northwest Africa as type species] based on morphological and chemical differences. The species in the genus are characterized by a pored epicortex, narrow grey lobes with subrotund apices, simple cilia and rhizines, a commonly maculate upper surface and cylindrical conidia (Elix, 1993). Just one species, *P. quercina*, occurs in both hemispheres. In a previous molecular study the Australian specimens of *P. quercina* were poly- or paraphyletic and were genetically distant from other populations from Europe, Africa and North America; on this basis and on some differences in morphological features (shape and size of ascospores) the Australian specimens were described as a new species *Parmelina elixia* (Argüello

Correspondence to: Ana Crespo. E-mail: acrespo@farm.ucm.es

et al., 2007). According to a recent classification by Crespo *et al.* (2007) based on a multi-locus dataset, the genus *Parmelina* belongs to the major 'parmeliod' clade within the larger, widely distributed family Parmeliaceae. Parmelioid lichens can be distinguished by their mainly foliose thalli (rarely subcrustose, subfruticose, peltate and umbilicate thalli), the rhizinate lower surface, laminal cupulate apothecia, *Lecanora*-type asci and simple hyaline ascospore (Blanco *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2007).

The present study aims at testing the monophyly of the species of *Parmelina* from both hemispheres, and investigating the generic status and the phylogenetic position of the Australasian species. We inferred the phylogenetic relationships of *Parmelina* and related taxa in a parsimony, Bayesian and likelihood framework using a concatenated alignment of nu ITS, nu LSU and mt SSU. Morphology, chemistry and phylogeographic patterns were re-evaluated in each of the monophyletic groups found in the molecular phylogeny.

Materials and methods

Molecular analysis: DNA-isolation, PCR-amplification and sequencing

Taxon sampling. Data matrices of 98 samples (93 species) of parmeliod lichens were assembled using sequences of nuclear ITS, LSU and mitochondrial SSU rDNA. Two species of *Usnea* were used as outgroup, since this genus has previously been shown to be closely related to parmeliod clade (Crespo *et al.*, 2007; Lumbsch *et al.*, 2008). The data set include a total of 300 sequences. Twenty-one new sequences of the nu LSU, ITS and mt SSU regions were obtained from seven different specimens corresponding to five *Parmelina* species from the southern hemisphere; 269 sequences from previous publications by our group (Blanco *et al.*, 2005; Divakar *et al.*, 2005; Argüello *et al.*, 2007; Crespo *et al.*, 2007) and 10 downloaded from GenBank. Data about the species (locality and collection data) as well as accession numbers for the sequences used in this analysis are compiled in Table 1.

DNA extraction, amplification and sequencing. For DNA extraction, small thallus fragments (*c.* 4 mm²) were separated from the main thallus with the help of forceps. Special care was taken to remove all possible contaminations and to avoid the presence of lichenicolous fungi. Samples were put in 1.5 ml tubes and DNA was extracted using the DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen®), following the manufacture protocol, with minor modifications (Crespo *et al.*, 2001). PCR reactions were prepared for a 25 µl final volume, containing 1.25 µl of each primer (10 µM), 17.5 µl of distilled water and 5 µl of the DNA template; PuReTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Health Care, Amersham Biosciences, 2004) were added to the mix according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out

either in a Techne® TC-3000 or in a PTC-100 Peltier® Thermal Cycler thermal cyclers, following conditions: one initial heating step of 4 min at 94°C, followed by a touch-down step of 6 cycles of 1 min at 94°C, 1.30 min at 61°C and 1.45 min at 72°C, decreasing 1°C each cycle the annealing temperature; after 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 54–56°C and 1.45 min at 72°C. A final extension step of 7 min at 72°C was added, after which the samples were kept at 4°C. The following primers were used for PCR amplifications: ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) and ITS4 (White *et al.*, 1990) for ITS; LR0R (Rehner & Samuels, 1994) and LR5 (Vilgalys & Hester, 1990) for nu LSU; and mrSSU1 and mrSSU3R (Zoller *et al.*, 1999) for mt SSU.

PCR products were purified using FavorPrep™ Gel/PCR Purification MiniKit (Favorgen® Biotech Corp.) following the manufacturer's instructions. Both complementary strands were sequenced using the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ReactionKit (Applied Biosystems) with the same primers used in the amplification step. Sequencing reactions were electrophoresed on a 3730 DNA analyser (Applied Biosystems) at the Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid). Sequence fragments obtained were checked and assembled in and manually adjusted in SeqMan v.7 (Lasergene®).

Sequence alignment and phylogenetic analysis. Sequences obtained from our samples were aligned with others obtained from the Gen Bank (see Table 1). A total of 98 ingroup taxa and 2 outgroup taxa (*Usnea antarctica* and *U. trachycarpa*) were used in the analysis. Six different matrices (ITS, nu LSU, mt SSU, ITS + nu LSU, ITS + mt SSU and nu LSU + mt SSU) were constructed and aligned using Muscle v3.6 (Edgar, 2004) and subsequently checked and improved by hand. Ambiguously aligned regions were removed from the alignment using Gblocks 0.91b (Castresana, 2000). Nucleotide substitution models were statistically selected with the help of jModelTest (Posada, 2008; program available at <http://darwin.uvigo.es>). Selection of the model was made taking into account the Akaike's information criterion (AIC; Akaike, 1974) and the Bayesian information criterion (BIC; Schwarz, 1978). Thus, the following models were used: (1) for ITS, the General Time Reversible substitution model (Tavaré, 1986) with estimation of invariant sites and assuming a gamma distribution with six rate categories (GTR+I+G) had the lowest -lnL value according to the AIC the model used, and the second lowest according to BIC (the lowest value in this case corresponded to the model SYM+I+G, not implemented either in MrBayes or PhyML); (2) for the nu LSU region, the model selected was also the GTR+I+G, the model with the lowest -lnL value regarding the AIC, and the third according the BIC, although the two models with lower -lnL values (TrNef+G and TrN+I+G) are not implemented in either MrBayes or in PhyML; (3) for the mt SSU region, the Hasegawa, Kishino and Yano model (Hasegawa *et al.*, 1985) assuming a gamma distribution with six rate categories

Table 1. Specimens used in the study, with location, reference collection detail and GenBank accession numbers. Newly obtained sequences for this study are in bold.

Species	Voucher specimens	Locality	Collector (s)	GenBank no. mt SSU	GenBank no. nu ITS	GenBank no. nu LSU
<i>Austroparmelina conlabrosa</i>	Herb Elix	Australia	Elix 38801	GU183190	GU183183	GU183176
<i>Austroparmelina elixia</i>	MAF-Lich 13962	Australia	Elix	DQ268577	DQ273859	DQ268557
<i>Austroparmelina endoleuca</i> 1	Herb Elix	Australia	Elix 38805	GU183191	GU183184	GU183177
<i>Austroparmelina endoleuca</i> 2	Herb Elix	Australia	Elix 38802	GU183192	GU183185	GU183178
<i>Austroparmelina labrosa</i>	MAF-Lich 15877	South Africa	Crepo <i>et al.</i>	GU183193	GU183186	GU183179
<i>Austroparmelina macrospora</i>	Herb Elix	Australia	Elix 32408	GU183194	GU183187	GU183180
<i>Austroparmelina pruinata</i>	MAF-Lich 14270	Australia	E. McCrum	EF025481	EF042905	EF042914
<i>Austroparmelina pseudorelicina</i> 1	MAF-Lich 16115	Australia	Amo & Elix	GU183195	GU183188	GU183181
<i>Austroparmelina pseudorelicina</i> 2	MAF-Lich 16114	Australia	Amo & Elix	GU183196	GU183189	GU183182
<i>Bulbothrix decurtata</i>	MAF-Lich 13988	South Africa	Crespo <i>et al.</i>	DQ287790	DQ279483	EU562672
<i>Bulbothrix meizospora</i>	GPGC 02-000786	India	Divakar	AY611127	AY611068	AY607780
<i>Canoparmelia caroliniana</i>	AFTOL-ID 6	—	—	AY584613	DQ782833	AY584634
<i>Canoparmelia texana</i>	GPGC 02-000637	India	Divakar	—	EF042906	EF042915
<i>Canoparmelia texana</i>	MAF-Lich 14273	Australia	Elix 31550	EF025482	—	—
<i>Cetrelia chicitae</i>	-	Philippines	Bawingan CL 0650	DQ923629	DQ980006	DQ923658
<i>Cetrelia olivetorum</i>	UPS	Great Britain	Wedin 6272	DQ923630	DQ980007	DQ923659
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	MAF-Lich 7465	Costa Rica	Trest 149	AY611128	AY611070	AY607782
<i>Everniastrum nepalense</i>	GPGC 02-000924	India	Divakar	AY611129	AY611071	AY607783
<i>Everniastrum rhizodendroides</i>	ABL	China	Aptroot 55665	DQ287797	DQ279489	EU562676
<i>Everniastrum sorocheilum</i>	MAF-Lich 10375	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287798	DQ279490	EU562677
<i>Everniastrum vexans</i>	ABL56597	China	Aptroot	DQ287799	DQ279491	EU562678
<i>Flavoparmelia baltimorensis</i>	MAF-Lich 7660	USA	Molina	AY586583	AY586559	AY584832
<i>Flavoparmelia caperata</i>	MAF-Lich 10175	China	Crespo <i>et al.</i>	AY586585	AY586561	AY584834
<i>Flavoparmelia soredians</i>	MAF-Lich 10176	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY586586	AY586562	AY584835
<i>Flavoparmelia springtonensis</i>	MAF-Lich 14271	Australia	Elix 31200	EF025483	EF042907	EF042916
<i>Flavopunctelia flaventior</i>	MAF-Lich 6046	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AF351164	AY581060	AY578923
<i>Hypotrachyna booralensis</i>	MAF-Lich 13969	Australia	Lumbsch	DQ287801	DQ279493	EU562682
<i>Hypotrachyna exsecta</i>	MAF-Lich 10380	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287807	DQ279498	EU562684
<i>Hypotrachyna immaculata</i>	MAF-Lich 7462	Australia	Louwhoff <i>et al.</i>	EU562696	AY611073	AY607785
<i>Hypotrachyna neodissecta</i>	MAF-Lich 13986	South Africa	Crespo <i>et al.</i>	DQ287820	DQ279510	EU562689
<i>Hypotrachyna osseoalba</i>	MAF-Lich 10390	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287822	DQ279512	EU562690
<i>Hypotrachyna pseudosinuosa</i>	MAF-Lich 10392	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287826	DQ279516	EU562692
<i>Hypotrachyna revoluta</i>	MAF-Lich 6047	Spain	Noya & Olea	AF351166	AY611075	AY607787
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	MAF-Lich 7640	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY611141	AY611084	AY607796
<i>Melanelixia glabra</i>	MAF-Lich 7634	Spain	Hawksworth	AY582300	AY581064	AY578927
<i>Melanelixia subargentifera</i>	MAF-Lich 9909	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY582301	AY581065	AY578928
<i>Melanelixia subaurifera</i>	MAF-Lich 10215	Great Britain	Crespo	AY611156	AY611099	AY607811

(Continued on next page)

Table 1. Specimens used in the study, with location, reference collection detail and GenBank accession numbers. Newly obtained sequences for this study are in bold. (Continued)

Species	Voucher specimens	Locality	Collector (s)	GenBank no. mt SSU	GenBank no. nu ITS	GenBank no. nu LSU
<i>Melanohalea elegantula</i>	MAF-Lich 10218	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY611135	AY611078	AY607790
<i>Melanohalea exasperata</i>	MAF-Lich 7636	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY611140	AY611083	AY607795
<i>Melanohalea olivacea</i>	MAF-Lich 7666	Finland	Vitikainen 16196	AY611148	AY611091	AY607803
<i>Melanohalea septentrionalis</i>	H	Finland	Ahti 60893	AY611150	AY611093	AY607805
<i>Melanohalea subelegantula</i>	NDA	USA	Esslinger 16132	AY611171	AY611115	AY607829
<i>Myelochroa aurulenta</i>	MAF-Lich 13992	India	Divakar	EF025484	DQ279530	EF042917
<i>Myelochroa irrugans</i>	MAF-Lich 10207	China	Crespo <i>et al.</i>	AY611160	AY611103	AY607815
<i>Myelochroa metarevoluta</i>	MAF-Lich 10208	China	Crespo <i>et al.</i>	AY611159	AY611102	AY607814
<i>Parmelia discordans</i>	MAF-Lich 10232	Great Britain	Hawksworth	DQ287841	AY583212	EF042918
<i>Parmelia saxatilis</i>	MAF-Lich 6804	Sweden	Ott	AF351172	AF350027	AY578947
<i>Parmelia serrana</i>	MAF-Lich 9756	Spain	Crespo & Divakar	AY582319	AY295109	AY578948
<i>Parmelia squarrosa</i>	MAF-Lich 7281	Japan	Flenniken 4737	AY611162	AY036975	AY607816
<i>Parmelia sulcata</i>	MAF-Lich 6054	Great Britain	Lambley	AY582320	AY581083	AY578949
<i>Parmelina carporrhizans</i>	MAF-Lich 6057	Spain	Crespo	AY611164	AY611105	AY607818
<i>Parmelina coleae</i> 1	MAF-Lich 13960	USA	Cole	DQ268575	DQ273857	DQ268555
<i>Parmelina coleae</i> 2	MAF-Lich 13961	USA	Cole	DQ268576	DQ273858	DQ268556
<i>Parmelina pastillifera</i>	MAF-Lich 6058	Spain	Crespo	EU562697	AY611104	AY607817
<i>Parmelina quercina</i> 1	MAF-Lich 13947	Spain	Crespo & Cole	DQ268562	DQ273844	DQ268542
<i>Parmelina quercina</i> 2	MAF-Lich 13950	Spain	Argüello	DQ268565	DQ273847	DQ268545
<i>Parmelina tiliacea</i> 1	MAF-Lich 6056	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AF351173	AY581084	AY578950
<i>Parmelina tiliacea</i> 2	MAF-Lich 13964	Spain	Argüello	DQ268579	DQ273861	DQ268559
<i>Parmelinella wallichiana</i>	MAF-Lich 7653	India	Chatterjee & Divakar	AY611165	AY611106	AY607819
<i>Parmelinopsis horrescens</i>	MAF-Lich 9913	Spain	Carballal	AY582321	AY581085	AY578951
<i>Parmelinopsis minarum</i>	MAF-Lich 7639	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY582322	AY581086	AY578952
<i>Parmelinopsis neodamaziana</i>	MAF-Lich 10182	Australia	Louwhoff <i>et al.</i>	AY611166	AY611107	AY607820
<i>Parmelinopsis subfatisceus</i>	MAF-Lich 6878	Australia	Louwhoff <i>et al.</i>	AF351174	AY611108	AY607821
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	MAF-Lich 7662	Austria	–	EU562698	AF410829	AY607822
<i>Parmeliopsis hyperopta</i>	MAF-Lich 10181	Spain	Blanco	AY611167	AY611109	AY607823
<i>Parmotrema cetratum</i>	MAF-Lich 7649	Uruguay	Osorio 9424	AY586598	AY586576	AY584847
<i>Parmotrema cetratum</i>	MVM 9425	Uruguay	Osorio 9425	AY648935	AY642847	–
<i>Parmotrema crinitum</i>	MAF-Lich 6061	Portugal	Crespo	EU562699	AY586565	AY584837
<i>Parmotrema fistulatum</i>	MAF-Lich 7655	Uruguay	Osorio 9423	AY582297	AY581057	AY578920
<i>Parmotrema haitiense</i>	MAF-Lich 7657	Australia	Louwhoff <i>et al.</i>	AY582295	AY581055	AY578918
<i>Parmotrema hypoleucinum</i>	MAF-Lich 7637	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY586590	AY586567	AY584839
<i>Parmotrema perforatum</i>	Cole 7983	USA	Cole 7983	AY586591	AY586568	AY584840
<i>Parmotrema perlatum</i>	MAF-Lich 6965	Portugal	Crespo <i>et al.</i>	AY586580	AY586566	AY584838
<i>Parmotrema pilosum</i>	MAF-Lich 7656	Uruguay	Sacarabino	AY582296	AY581056	AY578919
<i>Parmotrema pseudoreticulatum</i>	MAF-Lich 7650	Spain	Crespo	AY586600	AY586578	AY584849
<i>Parmotrema reticulatum</i>	MAF-Lich 10164	China	Crespo <i>et al.</i>	AY586599	AY586577	AY584848
<i>Parmotrema robustum</i>	MAF-Lich 10166	Portugal	Crespo <i>et al.</i>	EU562702	AY586569	AY584841
<i>Parmotrema subcaperatum</i>	HO 324283	Australia	Kantvilas	EU562703	AY586557	AY584829
<i>Parmotrema subinctorium</i>	GPGC 02-000696	India	Divakar	AY586582	AY586558	AY584830

(Continued on next page)

Table 1. Specimens used in the study, with location, reference collection detail and GenBank accession numbers. Newly obtained sequences for this study are in bold. (Continued)

Species	Voucher specimens	Locality	Collector (s)	GenBank no. mt SSU	GenBank no. nu ITS	GenBank no. nu LSU
<i>Parmotrema tinctorum</i>	MAF-Lich 10163	Australia	Louwhoff <i>et al.</i>	AY586593	AY586570	AY584842
<i>Punctelia borreri</i>	MAF-Lich 9919	Portugal	Crespo <i>et al.</i>	AY582324	AY581088	AY578954
<i>Punctelia pseudocoralloidea</i>	MAF-Lich 6922	Australia	Louwhoff <i>et al.</i>	AY586595	AY586572	AY584843
<i>Punctelia rudecta</i>	MAF-Lich 7661	USA	Molina	AY586596	AY586573	AY584844
<i>Punctelia subflava</i>	MAF-Lich 7322	Australia	Elix 42705	AF351183	AY586575	AY584846
<i>Punctelia subrudecta</i>	MAF-Lich 9918	Portugal	Crespo <i>et al.</i>	AY582325	AY581089	AY578955
<i>Remototrachyna adducta</i>	MAF-Lich 10206	China	Crespo <i>et al.</i>	AY785277	AY785270	AY785263
<i>Remototrachyna ciliata</i>	MAF-Lich 10185	China	Crespo <i>et al.</i>	AY785280	AY785273	AY785266
<i>Remototrachyna costaricensis</i>	MAF-Lich 10211	Costa Rica	Molina	AY785276	AY785273	AY785262
<i>Remototrachyna crenata</i>	MAF-Lich 10377	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287804	DQ279495	EU562683
<i>Remototrachyna flexilis</i>	MAF-Lich 13975	India	Divakar	DQ287809	DQ279500	EU562685
<i>Remototrachyna incognita</i>	MAF-Lich 10385	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287815	DQ279506	EU562687
<i>Remototrachyna infirma</i>	MAF-Lich 10210	China	Crespo <i>et al.</i>	AY785278	AY785271	AY785264
<i>Remototrachyna koyaensis</i>	MAF-Lich 10388	China	Crespo <i>et al.</i>	DQ287819	DQ279509	EU562688
<i>Usnea antarctica</i>	F	Antarctica	Lumbsch 19029c	EF116571	EF116567	EF116569
<i>Usnea trachycarpa</i>	F	Argentina	Lumbsch 19001c	EF116572	—	EF116570
<i>Usnea trachycarpa</i>	F	Argentina	Wirth & MessutiPA-12b	—	EF116568	—
<i>Xanthoparmelia conspersa</i>	MAF-Lich 6793	Spain	Blanco & Crespo	AF351186	AY581096	AY578962
<i>Xanthoparmelia isidiiovagans</i>	MAF-Lich 9956	Spain	Crespo & Divakar	AY582330	AY581094	AY578960
<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	MAF-Lich 6216	Spain	Blanco & Crespo	AY582339	AY581104	AY578972
<i>Xanthoparmelia semiviridis</i>	MAF-Lich 6876	Australia	Elix 30294	AF351158	AY581058	AY578921
<i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	MAF-Lich 9917	Spain	Crespo <i>et al.</i>	AY582329	AY581093	AY578959
<i>Xanthoparmelia tinctoria</i>	BCN 13862	Spain	Llimona	AY582345	AY581110	AY578978
<i>Xanthoparmelia vicentei</i>	MAF-Lich 7248	Spain	Crespo & Molina	AY582347	AY581112	AY578980

(HKY+G) was used, according to the BI (the model with the lowest $-\ln L$) and AI (the first of the models suggested implemented in MrBayes and PhyML). Same models were used for the different partitions in the analysis of the combined datasets. Every dataset was analysed using maximum likelihood, Bayesian Markov Chain Monte Carlo (B/MCMC) and parsimony approaches. Maximum likelihood analyses were carried out using PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) with 1000 non-parametric bootstrap replicates (Felsenstein, 1985) in order to assess confidence of the nodes. Bayesian analyses were carried out using MrBayes, 3.03b (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). The B/MCMC analysis was run for 5000K generations starting from a random tree, employing 12 simultaneous chains and using the default temperature of 0.2. Every 200th trees were sampled and the first 5000 trees were discarded as burn-in after visualization of the convergence of parameters in Tracer 1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2007). The posterior probabilities of each branch were calculated by counting the frequency

of trees that were visited during the course of the B/MCMC analysis. The 50% majority-rule consensus tree was obtained from the remained trees. The parsimony analysis was carried out in PAUP*4.0b10 (Swofford, 2003) performed at www.bioportal.uio.no, using heuristic search and 4000 bootstrap replicates. Phylogenetic trees were drawn with the program TreeView (Page, 1996).

We used a MP approach to examine the heterogeneity in phylogenetic signal among the three data partitions (De Queiroz, 1993; Buckley *et al.*, 2002). For the three genes and the concatenated analyses, the set of topologies reaching $\geq 70\%$ bootstrap under parsimony was estimated. The combined analysis topology was then compared for conflict with $\geq 70\%$ bootstrap intervals of the single locus analyses. If no conflict was evident, it was assumed that the two data sets were congruent and could be combined.

The majority-rule consensus tree based on 20 000 trees from the B/MCMC sample is shown in Fig. 1. The ML and parsimony analysis yielded similar topologies; branch

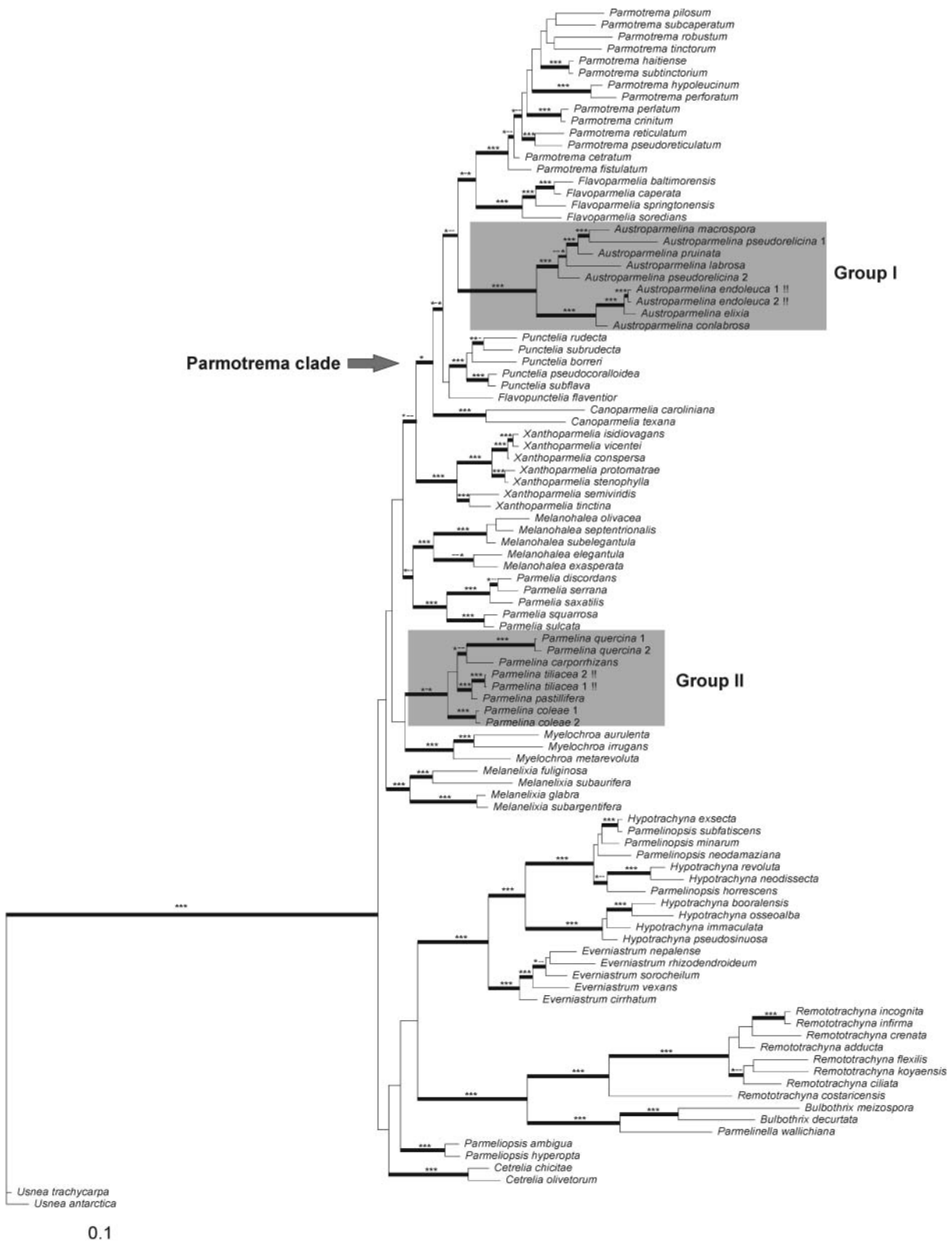


Fig. 1. Phylogenetic relationships among 100 taxa of Parmeliaceae, representing the main groups of parmelioid species and including the new genus *Austroparmelia*. Tree is based on the ITS, nu LSU and mt SSU regions analysed in a combined data matrix. Tree topology depicts the results of the B/MCMC analysis. Bold branches represent nodes supported either by posterior probability $PP \geq 95\%$, ML bootstrap $MLB \geq 70\%$ or parsimony bootstrap $PB \geq 70\%$ (first, second and third asterisks respectively). Exclamation marks depict the type species of the genera.

support values for the B/MCMC (PP ≥ 0.95) and the ML and parsimony bootstraps (MLB & BP ≥ 70) are indicated above branches. Bold branches have either PP, MLB or BP values above these thresholds and are considered as well supported.

Morphological and chemical studies

The morphology of the specimens was studied using a Leica Wild M 8 dissecting microscope for the assessment of lobe shape, size and width. All the specimens of Groups I and II included in the molecular analysis were studied (see Fig. 1, Table 1).

Vertical sections of apothecia were cut by razor blade and freezing microtome, and ascospores and the excipulum observed in water and lactophenol cotton-blue. Sections obtained were observed and photographed under LM (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Badhoevedrop, the Netherlands) using Nomarski differential interference contrast optics for microtome sections. Thirty to 50 ascospores were measured per specimen and mean values calculated.

Chemical constituents were identified by thin layer chromatography using standard methods (C.F. Culberson, 1972; Culberson & Johnson, 1982; Elix & Ernst-Russell, 1993).

Results

Phylogenetic studies

A total of seven new nuclear ITS, seven new LSU rDNA and seven new mitochondrial SSU rDNA sequences were generated (Table 1). These were aligned with 269 sequences previously published by us and 10 downloaded from GenBank (Table 1). The aligned matrix contained 472 unambiguous nucleotide position characters in nu ITS, 842 in nu LSU and 626 in mt SSU. The final alignment of combined data set was 1940 positions in length, with 757 variable characters. The nu ITS PCR product obtained ranged between 600 to 800 bp. Differences in size were due to the presence or absence of insertion of about 200 bp identified as group I introns (DePriest & Been, 1992; Gutierrez *et al.*, 2007). It was located in the 3' end of the small ribosomal DNA subunit (SSU) and the introns from ribosomal gene (18S) were removed from the analysis.

A parsimony analysis of combined data matrix resulted in 28 most parsimonious trees (tree length = 3323 steps, CI = 0.3443, RI = 0.7087). One hundred and fifty-two positions in the matrix were parsimony-uninformative, and 605 informative. The likelihood parameters of the Bayesian analysis had the following average values (\pm variance). ITS: rate matrix $r(AC) = 0.080549 (\pm 0.000095)$, $r(AG) = 0.172947 (\pm 0.000361)$, $r(AT) = 0.138325 (\pm 0.000175)$, $r(CG) = 0.037373 (\pm 0.000035)$, $r(CT) = 0.516006 (\pm 0.000730)$, $r(GT) = 0.054800 (\pm 0.000064)$;

base frequencies: $\pi(A) = 0.217538 (\pm 0.000198)$, $\pi(C) = 0.293411 (\pm 0.000198)$, $\pi(G) = 0.235150 (\pm 0.000248)$, $\pi(T) = 0.253901 (\pm 0.000149)$, $\alpha = 0.448179 (\pm 0.007806)$, $\text{pinvar} = 0.239262 (\pm 0.002126)$; mt SSU: $\kappa = 3.734737 (\pm 0.107508)$, base frequencies: $\pi(A) = 0.302220 (\pm 0.000181)$, $\pi(C) = 0.157714 (\pm 0.000099)$, $\pi(G) = 0.216088 (\pm 0.000129)$, $\pi(T) = 0.323978 (\pm 0.000200)$, $\alpha = 0.130176 (\pm 0.000053)$; nu LSU: rate matrix $r(AC) = 0.062998 (\pm 0.000099)$, $r(AG) = 0.154452 (\pm 0.000656)$, $r(AT) = 0.048711 (\pm 0.000094)$, $r(CG) = 0.029453 (\pm 0.000038)$, $r(CT) = 0.643115 (\pm 0.001398)$, $r(GT) = 0.061271 (\pm 0.000108)$, base frequencies: $\pi(A) = 0.234152 (\pm 0.000181)$, $\pi(C) = 0.239315 (\pm 0.000200)$, $\pi(G) = 0.307425 (\pm 0.000227)$, $\pi(T) = 0.219108 (\pm 0.000155)$, $\alpha = 0.140594 (\pm 0.000901)$, $\text{pinvar} = 0.283159 (\pm 0.007233)$.

Since the topologies of the MP, PhyML and B/MCMC analyses did not show any supported conflicts, only the 50% majority-rule consensus tree of Bayesian tree sampling is shown where the nodes in bold are those that received strong support (i.e. PP ≥ 0.95 in B/MCMC analysis and MP, PhyML bootstrap $\geq 70\%$) in all the three MP, PhyML and Bayesian analyses (Fig. 1). B/MCMC posterior probability PP $\geq 95\%$, ML bootstrap MLB $\geq 70\%$ or parsimony bootstrap PB $\geq 70\%$ are indicated above the branches with first, second and third asterisks, respectively.

Species of the genus *Parmelina* as circumscribed morphologically appear polyphyletic and fall into two separate strongly supported groups (Fig. 1). Group I includes five Australasian species of *Parmelina* (*P. conlabrosa*, *P. elixia*, *P. endoleuca*, *P. labrosa* and *P. pseudorelicina*) and two species of *Canoparmelia* (*C. pruinata* and *C. macrospora*) also known from Australasia. This Australasian lineage is clustered with parmotrema genera of Parmeliaceae and is sister to the genera *Parmotrema* and *Flavoparmelia*. The relationship is strongly supported. *Parmelina pseudorelicina* included in Group I is not monophyletic, indicating that additional studies are necessary to clarify the current species concept based primarily on morphological and chemical features. *Parmelina labrosa* also occurs in South Africa.

Group II, which contains northern hemisphere species of the genus *Parmelina* from western North America and the Mediterranean basin, is sister to *Myelochroa* (Fig. 1). The relationship lacks statistical support. The type species *Parmelina tiliacea* is clustered in Group II, therefore this group is considered to represent *Parmelina* s. str. The group includes five species, *P. carporrhizans*, *P. coleae*, *P. pastillifera*, *P. quercina* and *P. tiliacea*. Recently *P. atricha* has been resurrected from the south of France (Clerc & Truong, 2008).

Morphological and chemical studies

The morphology and chemistry of all the specimens included in Groups I and II (Fig. 1) have been re-investigated

Table 2. Major diagnostic features and geography of *Austroparmelina* and *Parmelina* s. str.

Features	<i>Austroparmelina</i>	<i>Parmelina</i> s. str.
Lobes	Sublinear to subirregular	Subirregular
Margins	Scarcely ciliate	Often ciliate
Exciple apices	Without a grey to carbonaceous stain (Figs 3, 5)	With a grey to carbonaceous stain (Figs 2, 4)
Outer exciple layer	Plectenchyma with \pm thick cell walls	Plectenchyma with \pm thin cell walls
Ascospore size	$(9-10-16.5(-18) \times (4-4.5-7(-8) \mu\text{m}$ ($n = 101$)	$(6.5)7-10.5(11.5) \times (4-4.5-6(-7.5) \mu\text{m}$ ($n = 103$)
Perispodium(TEM)	Usually > 150 nm thick ($n = 11$)	Usually < 70 nm thick ($n = 7$)
Medullary chemistry	Orcinol depsides, aliphatic acid, amino acid derivatives, naphthopyrones	Orcinol depsides
Distribution	Australasia, South Africa	Eurasia, western North America, North Africa

and major diagnostic characters are presented in Table 2. Species included in Group I are differentiated from Group II by several morphological features such as lobe morphology, excipular anatomy, ascospore size and cell wall ultra-structure. Chemistry and conidiospore size in both groups overlap and is therefore not a useful discriminator. Perispores do not show ornamentation in TEM studies neither in species clustered in Group I nor in Group II.

Taxonomy

Austroparmelina A. Crespo, Divakar & Elix, gen. nov.

Mycobank no. MB515449

TYPE SPECIES: *Austroparmelina endoleuca* (Fig. 8)

ETYMOLOGY: The epithet refers to Austral distribution, species superficially resembles to the *Parmelina*.

DIAGNOSIS: Thallus foliosus, adnatus, lobis angustis, 0.5–5.0 mm latis, apice rotundatis. Apothecia adnata vel substipitata, excipulum cupulatum, scleroplectenchymaticum, ascosporae ellipsoideae $(9-10-16.5(-18) \times (4-4.5-7(-8) \mu\text{m}$. Australasiae distributio.

Description

THALLUS: foliose, adnate to tightly adnate, irregularly lobate. Lobes flat, narrow, sublinear to subirregular; apices rounded, margins sparsely ciliate or rarely eciliate. Cilia simple. Upper surface, grey to grey green, rarely maculate, lacking pseudocyphellae, with or without soredia and isidia. Upper cortex palisade plectenchymatous, covered by a pored epicortex. Medulla white, loosely packed. Lower surface flat, smooth, black or dark to pale brown. Rhizines short, simple. Ascomata apothecial, laminal, sessile to subpedicellate; disc imperforate, concave, dark brown. *Cupulate proper exciple* consisting of plectenchyma with thick cell walls (Figs 3, 7); upper part of the proper exciple without dark pigmented stain (Figs 3, 5). Asci elongate, clavate, *Lecanora*-type, apically thickened, without an internal apical beak, 8-spored. Ascospores large, ellipsoid, $(9-10-16.5(-18) \times (4-4.5-7(-8) \mu\text{m}$ ($n = 101$). Coni-

diomata pycnidial, immersed, laminal. Conidia cylindrical $(5-6-9 \times 1 \mu\text{m}$ long ($n = 36$).

CHEMISTRY: Cortex containing atranorin and chloratranorin; medulla containing orcinol depsides (lecanoric acid), aliphatic acids (lichesterinic, protolichesterinic acid), amino acid derivatives (scabrosins) and naphthopyrones (euplectins).

REMARKS: *Austroparmelina* is characterized by the following combination of characters: narrow, sublinear to subirregular lobes with rounded apices, short, simple rhizines, and in having scleroplectenchymatous exciple, with non-carbonaceous upper part of excipular cells (carbonaceous in *Parmelina* s. str.) and large ellipsoid ascospores ranging from $(9-10-16.5(-18) \times (4-4.5-7(-8) \mu\text{m}$ (small, oval ascospores $(6.5)7-10.5(11.5) \times (4-4.5-6(-7.5) \mu\text{m}$ in *Parmelina* s. str.). The genus includes 13 species that grow on bark and rocks in southern and eastern Australia, Tasmania and New Zealand. Two species (*A. labrosa*, *A. pseudorelicina*) also occur in South Africa. The climate varies from Mediterranean (Western Australia, South Australia and western Victoria) to cool temperate (eastern Victoria, Tasmania and New Zealand) to warm temperate (eastern Australia). This new genus is only known from southern hemisphere while superficially resemble *Parmelina* s. str. is distributed in northern hemisphere.

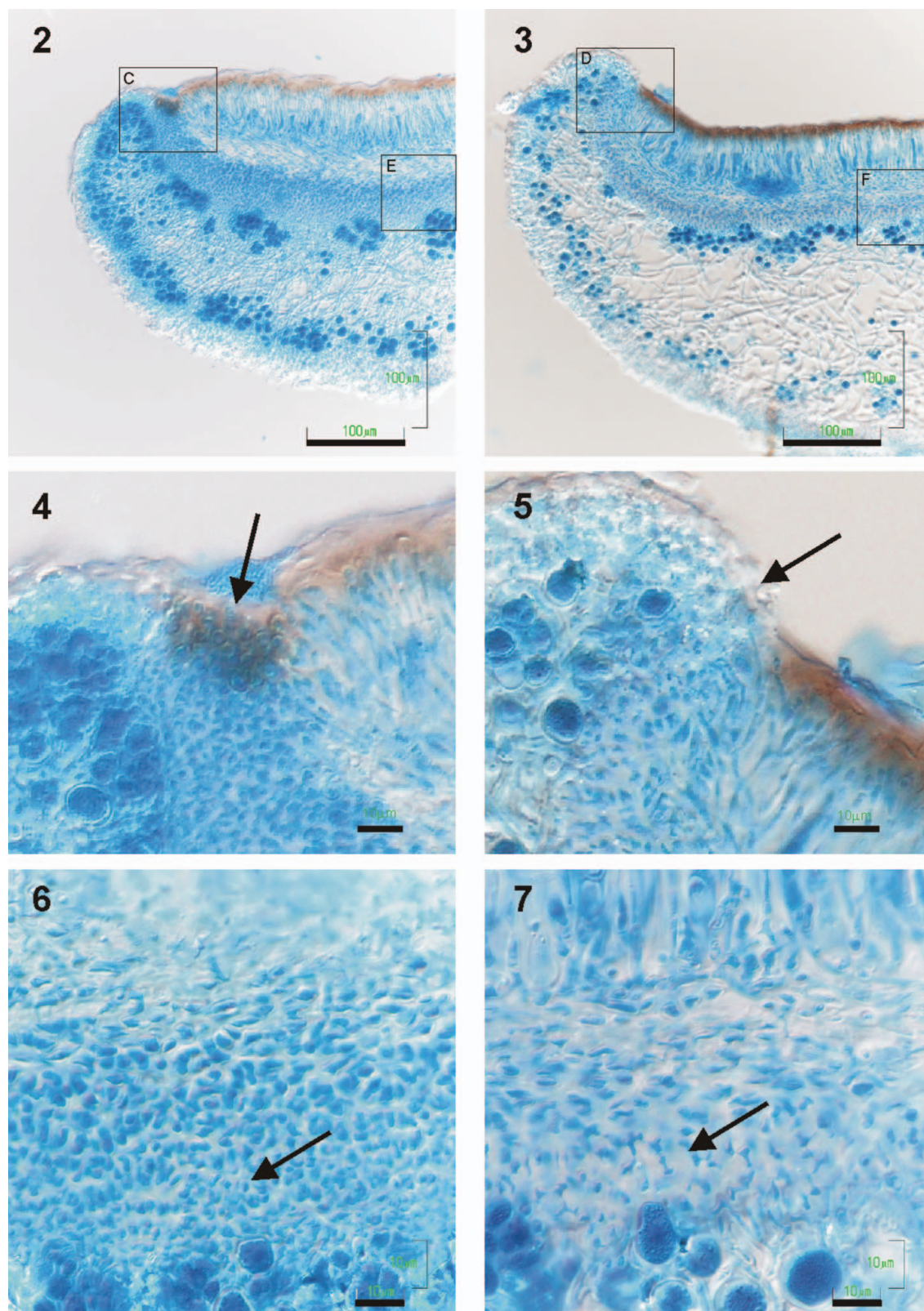
New combinations

Austroparmelina chlorolecanorica (Elix) A. Crespo, Divakar & Elix, comb. nov.
Mycobank no. MB515482

Parmeliopsis chlorolecanorica Elix, *Biblioth. Lichenol.* **95**, 177 (2007)

Austroparmelina conlabrosa (Hale) A. Crespo, Divakar & Elix, comb. nov.
Mycobank no. MB515483

Pseudoparmelia conlabrosa Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **31**, 25 (1976)



Figs 2–7. Exciple anatomy of *Parmelina* s. str. and *Austroparmelina*. (2, 4 & 6) *Parmelina quercina*; (3, 5 & 7) *Austroparmelina endoleuca*; (2 & 3) Overviews of cross section through apothecium; (4 & 5) Details showing presence and absence of dark pigmented stain in the outer part of the proper exciple (parathecium), indicated by arrows; (6 & 7) Details showing type of tissue in cupulate exciple, indicated by arrows. Bars = 100 μm in 2, 3 and 10 μm in 4–7.



Fig. 8. *Austroparmelia endoleuca* Habit (bar = 0.5 cm).

Parmelia conlabrosa (Hale) Elix & G.N: Stevens, *Austral. J. Bot.* **27**, 882 (1980)

Parmelina conlabrosa (Hale) Elix & J. Johnst., *Brunonia* **9**, 159 (1987)

Austroparmelia elixia (Arguello & A. Crespo) A.
Crespo, Divakar & Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515485

Parmelina elixia Arguello & A. Crespo, *Biol. J. Linn. Soc.* **91**, 465 (2007)

Austroparmelia endoleuca (Taylor) A. Crespo, Divakar
& Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515486

Parmelia endoleuca Taylor, *London. J. Bot.* **6**, 167 (1847)
Parmelina endoleuca (Taylor) Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **33**, 27 (1976)

Austroparmelia euplectina (Kurok. ex Elix) A. Crespo,
Divakar & Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515487

Parmelina euplectina Kurok. ex Elix, *Mycotaxon* **47**, 116 (1993)

Austroparmelia johnstoniae (Elix) A. Crespo, Divakar
& Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515488

Parmelina johnstoniae Elix, *Mycotaxon* **47**, 118 (1993)

Austroparmelia labrosa (Zahlbr.) A. Crespo, Divakar &
Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515489

Parmelia tenuirima var. *labrosa* Zahlbr., *Akad. Wiss. Wien. Math-Naturwiss. Kl. Denkschr.* **104**, 108 (1941)
Parmelia labrosa (Zahlbr.) Hale, *J. Jap. Bot.* **43**, 325 (1968)

Pseudoparmelia labrosa (Zahlbr.) Hale, *Phytologia* **29**, 190 (1974)

Parmelina labrosa (Zahlbr.) Elix & J. Johnst., *Brunonia* **9**, 160 (1987)

Austroparmelina macrospora (Elix & J. Johnst.) A.
Crespo, Divakar & Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515490

Canoparmelia macrospora Elix & J. Johnst., *Mycotaxon* **31**, 491 (1988)

Parmeliopsis macrospora (Elix & J. Johnst.) Elix, *Mycotaxon* **90**, 341 (2004)

Austroparmelina norpruinata (Elix & J. Johnst.) A.
Crespo, Divakar & Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515491

Canoparmelia norpruinata Elix & J. Johnst., *Mycotaxon* **31**, 492 (1988)

Austroparmelina pruinata (Müll. Arg.) A. Crespo,
Divakar & Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515492

Parmelia pruinata Müll. Arg., *Flora* **66**, 46 (1883)

Parmelina pruinata (Müll. Arg.) Hale, *Phytologia* **28**, 483 (1974)

Canoparmelia pruinata (Müll. Arg.) Elix & J. Johnst., *Brunonia* **9**, 158 (1987)

Austroparmelina pseudorelicina (Jatta) A. Crespo,
Divakar & Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515493

Parmelia pseudorelicina Jatta, *Boll. Soc. Bot. Ital.* **1910**, 254 (1911)

Parmelina pseudorelicina (Jatta) Kantvilas & Elix, *Muehlenia* **7**, 513 (1992)

Austroparmelina subarida (Elix) A. Crespo, Divakar &
Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515494

Canoparmelia subarida Elix, *Mycotaxon* **47**, 103 (1993)

Austroparmelina subtiliacea (Nyl.) A. Crespo, Divakar &
Elix, comb. nov.
MycoBank no. MB515495

Parmelia subtiliacea Nyl., *Flora* **68**, 614 (1885)

Pseudoparmelia subtiliacea (Nyl.) Hale, *Phytologia* **29**, 191 (1974)

Canoparmelia subtiliacea (Nyl.) Elix & Hale, *Mycotaxon* **27**, 279 (1986)

Discussion

The result of the present phylogenetic analyses (nuclear ITS, LSU rDNA and mitochondrial SSU rDNA data) supports that *Parmelina* is polyphyletic. Specimens from the northern and southern hemispheres form two distinct monophyletic groups (Fig. 1). One of the clades includes two species of *Canoparmelia* (*C. pruinata* and *C. macrospora*). This pattern contradicts the current concept of the genus *Parmelina* which was based on macro-morphological characters (Hale, 1974, 1976a; Elix, 1993; Divakar & Upreti, 2005). The polyphyly of genera has occasionally been discovered in molecular phylogenies of different families of lichenized fungi and particularly in the Parmeliaceae (e.g. Blanco *et al.*, 2004a, 2004b, 2005, 2006; Divakar *et al.*, 2006; Wirtz *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2007).

The two centres of distribution of *Parmelina*, in Eurasia and Australasia, have previously been noted by Elix (1993). The northern hemisphere distribution of *Parmelina* is disjunct (W.L. Culberson, 1972) evidencing a Madrean–Thethian pattern; the genus is hardly present in Asia but is widely distributed in Europe and Morocco (Mediterranean basin); in North America it is practically restricted to California (sharing the mediterranean climate). In Asia *Parmelina* is apparently replaced by its sister genus *Myelochroa* (Divakar *et al.*, 2010) which is common in Japan and neighbouring regions. No species of *Parmelina* is found in both hemispheres (Argüello *et al.*, 2007).

The two groups of species are very similar in most of the macro-morphological features but in spite of this apparent homogeneity, fine morphological structures especially in the ascoma anatomy are evident. Structure of the proper exciple in Parmeliaceae is an important character (Divakar *et al.*, 2010) that has been neglected due to the frequent absence of asomata in samples. On comparing the apothecia of specimens of the two groups, the presence or absence of a dark pigmented stain in the upper part of the proper exciple (parathecium) is a constant character that was not observed previously (Figs 2, 4; Table 2); however, the chemical nature or biological meaning of this feature is unknown. Furthermore, we found that the anatomical characteristics of the exciple are different between the two clades. Species in Group I have a cupulate exciple consisting of plectenchyma with thick cell walls (Figs 3, 7) while the exciple of the taxa included in Group II is composed of plectenchyma with thin cell walls (Figs 2, 6). Upper cortex anatomy is also re-evaluated and species included in Group I and II show a high plasticity. The paraplectenchyma found in taxa of both groups ranges from species with hyphae thicker to thinner cell walls.

In our phylogenetic tree, the Australasian species (Group I) are strongly related to parmotrema groups (*Parmotrema* and *Flavoparmelia*). However, the species differ from *Parmotrema* in having adnate thalli, narrow lobes, rhizines on the lower surface reaching to the margins and cylindrical

conidia; and from *Flavoparmelia* in having a grey upper cortex (containing atranorin). All these branches (including the large genus *Xanthoparmelia*) include taxa with optimal representation in the southern hemisphere. Contrarily, the species clustered in the Group II are from the northern hemisphere, and related to *Myelochroa* (Fig. 1). The strong relationship of the northern hemisphere *Parmelina* species with *Myelochroa* and other hypotrachnoid genera has been shown in our previous molecular study (Crespo *et al.*, 2007).

Given the corroborating molecular, morphological, and geographical data, we propose to segregate *Parmelina* into two genera. Since the type species is included in Group II (*P. tiliaacea*), this group is considered as *Parmelina* s. str. and the second group (Australasian Group I) is described as a new genus. The two species of *Canoparmelia* nested within the latter clade were found to be morphologically similar to the other species and are also included in this new genus. However, the type species of *Canoparmelia* is *C. texana* and this forms an independent, monophyletic group (Fig. 1). Thus a new name for the genus is required and we have chosen *Austroparmelina* because of its geographical distribution. In this revised concept the genus *Parmelina* s. str. includes 10 species distributed only in the northern hemisphere. In our morphological and chemical re-evaluation we found that three more species of *Canoparmelia* (*C. norpruinata*, *C. subarida* and *C. subtiliaacea*) and one recently described in *Parmeliopsis* (*P. chlorolecanorica* Elix, 2007) have similar features as the Australasian species clustered in Group I. Since these species share the common Australasian distribution they should also be included in the current concept of *Austroparmelina*.

Acknowledgements

The authors thank two anonymous referees for improving the manuscript. This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL 2007-64652/BOS, CGL2008-01125-E/BOS), Ramon y Cajal grant (RYC02007-01576) to PKD and FPU grant to ZF. DNA extraction and PCR amplification was performed in SYSTEMOL lab (UCM Madrid). Sequencing was carried out in the Centro de Genómica y Proteómica del Parque Científico de Madrid and M. Isabel García Saez is especially thanked.

References

- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**, 716–723.
- ARGÜELLO, A., DEL PRADO, R., CUBAS, P. & CRESPO, A. 2007. *Parmelina quercina* (Parmeliaceae, Lecanorales) includes four phylogenetically supported morphospecies. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**, 455–467.
- BLANCO, O., CRESPO, A., DIVAKAR, P.K., ELIX, J.A. & LUMBSCH, H.T. 2005. Molecular phylogeny of parmotrema lichens (Ascomycotina, Parmeliaceae). *Mycologia* **97**, 150–159.

- BLANCO, O., CRESPO, A., DIVAKAR, P.K., ESSLINGER, T.L., HAWKSWORTH, D.L. & LUMBSCH, H.T. 2004b. *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *Mycological Research* **108**, 873–884.
- BLANCO, O., CRESPO, A., ELIX, J.A., HAWKSWORTH, D.L. & LUMBSCH, H.T. 2004a. A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* **53**, 959–975.
- BLANCO, O., CRESPO, A., REE, R.H. & LUMBSCH, H.T. 2006. Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**, 52–69.
- BUCKLEY, T.R., ARENSBURGER, P., SIMON, C. & CHAMBERS, G.K. 2002. Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand cicada genera. *Systematic Biology* **5**, 14–18.
- CASTRESANA, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 540–552.
- CLERC, P. & TRUONG, C. 2008. The non-sorediate and non-isidiate *Parmelina* species (lichenized ascomycetes, Parmeliaceae) in Switzerland – *Parmelina atricha* (Nyl.) P. Clerc reinstated in the European lichen flora. *Sauteria* **15**, 175–194.
- CRESPO, A., BLANCO, O. & HAWKSWORTH, D.L. 2001. The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilizing generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* **50**, 807–819.
- CRESPO, A., LUMBSCH, H.T., MATSSON, J.E., BLANCO, O., DIVAKAR, P.K., ARTICUS, K., WIKLUND, E., BAWINGAN, P.A. & WEDIN, M. 2007. Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in Parmeliaceae (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear *RPB1* gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 812–824.
- CULBERSON, C.F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography* **72**, 113–125.
- CULBERSON, C.F. & JOHNSON, A. 1982. Substitution of methyl *tert*-butyl ether for diethyl ether in the standardized thin-layer chromatographic method for lichen products. *Journal of Chromatography* **238**, 483–487.
- CULBERSON, W.L. 1972. Disjunctive distributions in the lichen-forming fungi. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **59**, 165–173.
- CULBERSON, W.L. & CULBERSON, C.F. 1981. The genera *Cetrariastrum* and *Concamerella* (Parmeliaceae): a chemosystematic synopsis. *Bryologist* **84**, 273–314.
- DEPRIEST, P.T. & BEEN, M.D. 1992. Numerous group I introns with variable distributions in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *Journal of Molecular Biology* **228**, 315–321.
- DE QUEIROZ, A. 1993. For consensus (sometimes). *Systematic Biology* **42**, 368–372.
- DIVAKAR, P.K., BLANCO, O., HAWKSWORTH, D.L. & CRESPO, A. 2005. Molecular phylogenetic studies on the *Parmotrema reticulatum* (syn. *Rimelia reticulata*) complex, including the confirmation of *P. pseudoreticulatum* as a distinct species. *Lichenologist* **37**, 55–65.
- DIVAKAR, P.K., CRESPO, A., BLANCO, O. & LUMBSCH, H.T. 2006. Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical *Hypotrachyna* clade of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**, 448–458.
- DIVAKAR, P.K., LUMBSCH, H.T., FERENCIOVA, Z., DEL PRADO, R. & CRESPO, A. 2010. *Remototrachyna*, a new tropical lineage in hypotrachynoid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) originated in India. *American Journal of Botany* **97**, 579–590.
- DIVAKAR, P.K. & UPRETI, D.K. 2005. *Parmelioid Lichens in India (A Revisionary Study)*. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun, India.
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792–1797.
- ELIX, J.A. 1993. Progress in the generic delimitation of *Parmelia* sensu lato lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a synoptic key to the Parmeliaceae. *Bryologist* **96**, 359–383.
- ELIX, J.A. 2007. New species in the lichen family Parmeliaceae (Ascomycota) from Australasia. *Bibliotheca Lichenologica* **95**, 171–182.
- ELIX, J.A. & ERNST-RUSSELL, K.D. 1993. *A Catalogue of Standardized Thin Layer Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances*. Second Edition. Australian National University, Canberra.
- ELIX, J.A. & HALE, M.E. JR. 1987. *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis* and *Parmotremopsis*, five new genera in the Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* **29**, 233–244.
- ELIX, J.A., JOHNSTON, J. & VERDON, D. 1986. *Canoparmelia*, *Paraparmelia* and *Relicinopsis*, three new genera in the Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* **27**, 271–282.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- GARDES, M. & BRUNS, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**, 113–118.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. 2003. PhyML – A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696–704.
- GUTIERREZ, G., BLANCO, O., DIVAKAR, P.K., LUMBSCH, H.T. & CRESPO, A. 2007. Patterns of group I intron presence in nuclear SSU rDNA of the lichen family Parmeliaceae. *Journal of Molecular Evolution* **64**, 181–195.
- HALE, M.E. JR. 1974. *Bulbothrix*, *Parmelina*, *Relicina*, and *Xanthoparmelia*, four new genera in the Parmeliaceae. *Phytologia* **28**, 479–490.
- HALE, M.E. JR. 1976a. A monograph of the lichen genus *Parmelina* Hale (Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* **33**, 1–60.
- HALE, M.E. JR. 1976b. A monograph of the lichen genus *Pseudoparmelia* Lynge (Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* **31**, 1–62.
- HALE, M.E. JR. 1984. An historical review of the genus concept in lichenology. *Beiheft zur Nova Hedwigia* **79**, 11–23.
- HALE, M.E. JR. 1986. *Flavoparmelia*, a new genus in the lichen family Parmeliaceae (Ascomycotina). *Mycotaxon* **25**, 603–605.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H. & YANO, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**, 160–174.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. 2001. MRBAYES, Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- KROG, H. 1982. *Punctelia*, a new lichen genus in the Parmeliaceae. *Nordic Journal of Botany* **2**, 287–292.
- KUROKAWA, S. 1991. *Rimeliella*, a new lichen genus related to *Rimelia* of the Parmeliaceae. *Annals of the Tsukuba Botanical Garden* **10**, 1–14.
- LUMBSCH, H.T., HIPPEL, A.L., DIVAKAR, P.K., BLANCO, O. & CRESPO, A. 2008. Accelerated evolutionary rates in tropical

- and oceanic parmelioid lichens (Ascomycota). *BMC Evolutionary Biology* **8**, Article No. 257.
- MATTSSON, J.E., ARTICUS, K., WIKLUND, E. & WEDIN, M. 2004. The monophyletic groups within the Parmeliaceae. In: ARTICUS, K., Ed., *Phylogenetic Studies in Usnea (Parmeliaceae) and Allied Genera*. Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 931. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- PAGE, R.D.M. 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357–358.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253–1256.
- RAMBAUT, A. & DRUMMOND, A.J. 2007. *Tracer v1.4*. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 1 March 2010).
- REHNER, S.A. & SAMUELS, G.J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **98**, 625–634.
- SCHWARZ, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* **6**, 461–464.
- SIPMAN, H. 1980. Studies on Colombian cryptogams. X. The genus *Everniastrum* Hale and related taxa (Lichenes). *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, ser C*, **83**, 333–354.
- SIPMAN, H. 1986. Notes on the lichen genus *Everniastrum* (Parmeliaceae). *Mycotaxon* **26**, 235–251.
- SWOFFORD, D.L. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other Methods), Version 4.0 b10*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TAVARÉ, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences* **17**, 57–86.
- THELL, A., FEUERER, T., ELIX, J.A. & KARNEFELT, I. 2006. A contribution to the phylogeny and taxonomy of *Xanthoparmelia* (Ascomycota, Parmeliaceae). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **100**, 797–807.
- VILGALYS, R. & HESTER, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**, 4238–4246.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J., Eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- WIRTZ, N., PRINTZEN, C., SANCHEZ, L. & LUMBSCH, H.T. 2006. The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) revisited. *Taxon* **55**, 367–376.
- ZOLLER, S., SCHEIDEGGER, C. & SPERISEN, C. 1999. PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* **31**, 511–516.

Capítulo V

***Notoparmelia*, a new genus based on the overlooked apothecial anatomy and distribution pattern.**

Manuscrito inédito, en preparación

RESUMEN

***Notoparmelia*, un nuevo género basado en anatomía del apotecio y en patrón de distribución**

Se presenta otro caso que muestra la importancia de la anatomía y morfología fina de las estructuras reproductivas para la sistemática de la familia *Parmeliaceae*. Se describe el nuevo género *Notoparmelia* formado por especies de *Parmelia* de Australasia. Se conocía que estas especies forman un linaje monofilético pero no se conocían caracteres correlacionados que sirvieran para su delimitación frente al resto de las especies de *Parmelia*. La circunscripción de este género se apoya como carácter principal en un rasgo que no había sido considerado previamente, la anatomía del apotecio. El excípulo propio está reducido a una capa compuesta exclusivamente por las largas hifas sin patrón de ramificación y embebidas en abundante matriz de polisacáridos, diferenciándose del resto de los parmeliáceos con la estructura basal de apariencia cortical en excípulo propio compuesto por tres capas. Esta característica, junto con el grosor de las paredes de las esporas y otros caracteres morfológicos como la morfología de los lóbulos y el tipo rizinas permite un diagnóstico preciso del nuevo género. El área de distribución es también útil para la caracterización de este género. Se proponen 17 combinaciones nuevas.

***Notoparmelia*, a new genus of *Parmeliaceae* (Ascomycota) based on the overlooked generative anatomical features, phylogeny and distribution pattern.**

Zuzana FERENCOVA, Paloma CUBAS and Ana CRESPO*

Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.

*Corresponding author: Ana Crespo; E-mail address: acrespo@farm.ucm.es

Phone: +34 913941708

Fax: +34 913941774

ABSTRACT

Another case that highlights the importance of the anatomy and fine morphology of reproductive structures for the systematics of the family *Parmeliaceae* is presented. The new genus *Notoparmelia* is described for Australasian species of *Parmelia*. These species were known to form a monophyletic lineage but correlated characters for its delimitation were lacking. A major characteristic used here for the circumscription of this genus is the overlooked apothecial anatomy. The proper exciple is reduced to one layer composed exclusively by large hyphae without branching pattern embedded in abundant polysaccharide matrix, differing from the rest of *Parmeliaceae* with basal cortex-like structure in three-layered proper exciple. This feature together with the thickness of spore walls and other morphological characters like lobe morphology, pseudocyphellae and rhizine type allow a precise diagnosis of the new genus. The area of distribution is also useful for characterizing this genus. Seventeen new combinations are proposed.

Key words: Ascomycota, proper exciple, spore wall, taxonomic characters, new genus, *Parmeliaceae*, *Notoparmelia*.

INTRODUCTION

For many years, the delimitation of genera in the lichenized fungi was based on morphological, anatomical and chemical characters, and in the last three decades a number of genera were described in *Parmeliaceae* using these features (e. g. Hale 1974a, b, 1976, 1984, 1986a, b; Culberson & Culberson 1981; Krog 1982; Elix *et al.* 1986; Elix & Hale 1987; Henssen 1991, 1992; Kurokawa 1991; Elix 1993b). However, more recently the delimitation of these genera has been re-evaluated based mainly on molecular phylogenies (e.g. Blanco *et al.* 2004a, b, 2005; Divakar *et al.* 2006; Thell *et al.* 2006; Wirtz *et al.* 2006; Amo de Paz *et al.* 2010; Crespo *et al.* 2010b). Phylogenetic studies showed that some genera, circumscribed on the basis of a few morphological and/or chemical characters, were polyphyletic, and in some cases, the smaller monophyletic groups tend to have distinct distribution patterns (Crespo *et al.* 2010a, b; Divakar *et al.* 2010). In some cases these studies revealed previously undetected morphological characters of phylogenetic or taxonomic significance (del Prado *et al.* 2007; Crespo *et al.* 2010a, b), or allowed segregation of new genera using both molecular and morphological data (Blanco *et al.* 2004b).

Parmelia was described by Acharius (1803) in a very broad sense, encompassing a large number of foliose lichens with lecanorine apothecia, including such diverse genera as *Cetraria*, *Lobaria*, *Parmelia* s.lat., *Physcia*, and *Xanthoria*. By the end of the 19th century *Parmelia* began to assume its modern circumscription, being described as a foliose rhizinate genus with laminal apothecia and simple spores (Fries 1861). The controversial history of *Parmelia* with segregation into new genera, followed by synonymization of some of them, is discussed in Hale (1987) and Crespo *et al.* (2011). Hale (1987) included in *Parmelia* s. str. a small assemblage of 38 species, typified by *P. saxatilis*, and later on 13 new species were added (Elix 1993a, 2007; Kurokawa 1994; Elix & Kantvillas 1995; Calvelo & Adler 1999; Feuerer & Thell 2002; Divakar *et al.* 2003, 2005; Molina *et al.* 2004, 2011a, b; Lumbsch *et al.* 2011). In its present delimitation *Parmelia* is a widespread genus with three centres of diversification (Hale 1987), one in boreal-temperate Europe and North America, a second one in eastern Asia and the third one in Australasia.

Parmelia belongs to the major ‘parmelioid’ clade within the large and widely distributed family *Parmeliaceae*. Parmelioid lichens can be distinguished by their mainly foliose thalli (rarely subcrustose, subfruticose, peltate and umbilicate thalli), the rhizinate lower surface, laminal cupulate apothecia, *Lecanora*-type asci, and simple ellipsoid hyaline ascospores (Blanco *et al.* 2006; Crespo *et al.* 2007; Crespo *et al.* 2010b). The *Parmelia* species are characterized by adnate, sublinear to subirregular lobes without cilia; upper surface with effigurate pseudocyphellae, lower surface black, rhizinate (rhizines simple, furcate or squarrosely branched); simple spores, 8 per ascus; conidia cylindrical or weakly

bifusiform, less than 8.0 μm long; with atranorin and chloratranorin in the cortex (Hale 1987).

In a comprehensive molecular study based on a multi-locus dataset of parmelioid lichens (Crespo *et al.* 2010b) *Parmelia* was shown to split into three separate clades (Fig. 1). One of them (the Nipponoparmelia clade) contains Japanese species that differs morphologically from other *Parmelia* species by having small punctate pseudocyphellae on the lobe edges. This group of species were previously organized by Kurokawa (1994) in the small subgenus *Nipponoparmelia* and latter elevated to generic rank (Crespo *et al.* 2010b). A second group of predominantly Australasian species, related to *P. signifera*, forms a well-supported clade but no distinct morphological characteristics were found. The third group (*Parmelia* s. str.) contains the rest of *Parmelia* species, mostly temperate species, with a center of distribution in the Northern Hemisphere (Crespo *et al.* 2010b).

In a general survey of the morphology and anatomy of the reproductive structures in *Parmeliaceae*, Ferencova (2012) found greater variability than expected and promising features that could help in the morphological characterization of the genera. Five types of spores, based on size, form and spore wall thickness were established for parmelioid lichens. Also different types of internal organization of the apothecium were found and described. The present study aims to find good diagnostic morphological and anatomical characters to circumscribe the monophyletic group of Australasian species found in the assemblage of *Parmelia* with special emphasis in ascomata structure and spore types.

MATERIALS AND METHODS

Taxon sampling

In the present study 16 fertile species from two major monophyletic clades, *Parmelia* and *Nipponoparmelia*, (Crespo *et al.* 2010b) were investigated. One *Parmelina* species was included for comparison. Details of the studied material (locality and collection data) are summarized in Table 1. Moreover, descriptions of all species of the *Parmelia* assemblage were compiled from bibliography and used to create a comparative matrix (not included).

Morphological studies

Vertical sections through the central part of three apothecia per specimen were cut with a razor blade under the dissecting microscope (Leica Wild M 8) and mounted in water and lactophenol cotton-blue (Panreac, Barcelona). The structure of the sections and morphology of the spores were observed and photographed with a light microscope (Nikon Eclipse 80i;

Nikon, Badhoevedrop, Netherlands) using Nomarski differential interference contrast optics. The length and width of spores, and the thickness of their wall were measured in thirty to fifty ascospores per specimen. Mean values of the spore size and ratio between length and width (Q) were calculated. Moreover, thallus morphology of the specimens was studied using a dissecting microscope for the assessment of lobe shape, size and width.

RESULTS

The morphology of all the specimens included in Groups 1, 2 and 3 (Fig. 1) have been re-investigated and major diagnostic characters are presented in Table 2. Species of the new genus *Notoparmelia* included in Group 1 differ from *Parmelia* s. str. (Group 2) and *Nipponoparmelia* (Group 3) by several morphological features such as lobe morphology, rhizine type, pseudocyphellae structure, structure of proper exciple and ascospore type (defined by spore size and spore wall thickness). Chemistry and conidiospore size and form in three groups overlap and do not help to distinguish these monophyletic groups.

The most important differences here discovered were found in the internal structure of the apothecia (Fig. 2) and the spore wall thickness (Fig. 3). Species in the Group 1 (*Notoparmelia*) have large apothecia usually with disc radially splitted (Fig. 4). The proper exciple is formed by the thick cupulate hyaline layer, composed of large hyphae embedded in abundant polysaccharide matrix (Fig. 2A, C). The hyaline layer is surrounded directly by the continuous algal layer. *Notoparmelia* lacks the intermediate layer and cortex-like basal structure of the proper exciple which are present in Groups 2, 3 and in rest of *Parmeliaceae* (Fig. 2B, E). These structures form a barrier separating the medulla from the hyaline layer. The hyphae of the hyaline layer in *Notoparmelia* do not show any organization: they are large and unbranched, and traverse the hyaline layer apparently connecting the subhymenium with the medulla. In *Notoparmelia tenuirima*, the hyphae in the lower part of hyaline layer change direction and are vertically orientated but without any clear branching (Fig. 2D).

The structure of the proper exciple reflects its organization in the early ontogenetic stages of the apothecium. In *Notoparmelia* the hyphae are radially oriented between the future subhymenium, composed of ascogenous hyphae, and the thalline tissue of the apothecium (Fig. 2F). In comparison, in other parmelioid species (e.g. *Parmelina quercina*) the developing proper exciple at the same stage is subdivided in an upper hyaline layer and a lower part composed of branching hyphae (Fig. 2G). The internal structure of the apothecium of Group 1 (*Notoparmelia*) (Fig. 2 A) represents type A-V of the parmeliaceous apothecium, meanwhile the Group 2 (*Parmelia* s. str.) has apothecium of type A-II or A-III and Group 3 (*Nipponoparmelia*) has apothecium of type A-III (Ferencova 2012).

The spore characteristics in *Parmelia* and *Nipponoparmelia* clades are shown in Fig.3. The spores of four studied species of the Group 1 (*Notoparmelia erumpens*, *N. tenuirima*, *N. signifera*, *N. subtestacea*) are medium-sized ($11.5\text{--}15.5\text{ }\mu\text{m} \times 7.5\text{--}10.0\text{ }\mu\text{m}$), broadly ellipsoidal to ellipsoidal ($Q = 1.48 - 1.83$) and with thin to medium spore wall (400-700 nm). These characteristics correspond to type S-II of spores described for parmelioid lichens (Ferencova 2012). The spores of *Notoparmelia crambidiocarpa* fit to type S-III of parmelioid spores because they are large ($17.0\text{--}18.0\text{ }\mu\text{m} \times 11.0\text{--}12.0\text{ }\mu\text{m}$), ellipsoidal ($Q = 1.56$), with thick wall (1000-1200 nm). Another twelve species reported by Hale (1987), Elix (1993, 2007), Elix & Kantvillas (1995), Lumbsch *et al.* (2011), which possibly form part of this group because the morphology and distribution pattern (restricted to Australia and/or New Zealand), were not studied here because the lack of fertile material or material at all. According to the data provided by those authors, they have also spores of type S-II.

The spores of the five studied species of Group 2 (*Parmelia cochleata*, *P. fertilis*, *P. omphalodes*, *P. saxatilis*, *P. sulcata*) fit to type of spores S-III (Fig. 3); they are medium to large ($12.0\text{--}16.5\text{ }\mu\text{m} \times 6.5\text{--}10.5\text{ }\mu\text{m}$), broadly ellipsoidal to ellipsoidal ($Q = 1.38 - 1.86$) with thick spore wall (1000-1800 nm). *Parmelia adaugescens* has spore of type S-IV, very large ($21.0\text{--}23.5\text{ }\mu\text{m} \times 11.5\text{--}15.5\text{ }\mu\text{m}$), ellipsoidal ($Q = 1.80$) with very thick wall (2500-3500 nm). Another species reported by Hale (1987) and other authors (Calvelo & Adler 1999, Feuerer & Thell 2002, Divakar *et al.* 2003), which possibly form part of this group because the morphology and distribution pattern, were not studied here because the lack of fertile material or material at all. After Hale's description, the majority of them present spores of types III and IV, although he found two species with the spore type S-I (*P. meiophora* and *P. submutata*).

The spores of two species of the Group 3 (*Nipponoparmelia laevior*, *N. ricasolioides*) fit to type S-V (Fig. 3). They are large to very large ($17.0\text{--}20.5\text{ }\mu\text{m} \times 7.5\text{--}13.0\text{ }\mu\text{m}$) with medium spore wall thickness (600-800 nm). They are ellipsoidal in *N. ricasolioides* ($Q = 1.61$) and elongated in *N. laevior* ($Q = 2.12$).

Based on the morphology, *Notoparmelia* is composed of two species complex. The *Notoparmelia testacea* complex is composed of six corticolous species divided by their morphological characters in two groups. This corticolous species complex has sublinear to subirregular lobes and present an almost continuous white rim around the lobe margins formed by pseudocyphellae. No vegetative propagules are developed. The two groups are: (a) the *Notoparmelia testacea* group, characterized by pale greenish to gray thalli with roundish marginal secondary lobes and lower surface black with distinct bare to papillate brown zone around the margins. It contains three species (*N. nortestacea*, *N. subtestacea*, *N. testacea*) with allopatric distribution, which also differ in the medullary chemistry (Hale 1987, Elix 2007). (b) The *Notoparmelia crambidiocarpa* group is characterized by the

whitish grey thalli with the dense rhizines projecting a mat around lobe margins. It contains three species (*N. crambidiocarpa*, *N. norcrambidiocarpa*, *N. salcrambidiocarpa*) which differ in chemical pattern (Hale 1987). Moreover, *N. crambidiocarpa* has larger spores than two other species.

The *Notoparmelia signifera* complex is more complicated, it is composed of eleven species divided by their morphological characteristics into two groups. The species included are corticolous and/or saxicolous, present small effigurate pseudocyphellae and different reproductive strategies. The two groups are: (c) the *Notoparmelia signifera* group, characterized by whitish grey to grey thalli, small effigurate pseudocyphellae, lower surface black with distinct bare to papillate brown zone around the margins and salazinic acid in the medulla. It contains six species, three of them isidiate (*N. crowii*, *N. novae-zelandiae*, *N. pseudotenuirima*) and two without isidia (*N. queenslandensis*, *N. signifera*, *N. tenuirima*). They differ in distribution and ecological requirements (Hale 1987). Moreover, *N. tenuirima* forms large thalli and *N. signifera* is saxicolous and the most common of the species. (d) The *Notoparmelia cunninghamii* group is characterized by pale greenish to grey thalli with developed soralia. Here we include five species (*N. asiatica*, *N. cunninghamii*, *N. erumpens*, *N. protosulcata*, *N. tarkinensis*) which are the only species of this genus found out of Australia (Hale 1987, Lumbsch *et al.* 2011).

DISCUSSION

The genus *Parmelia* was shown to be polyphyletic (Crespo *et al.* 2010b) and composed by three monophyletic groups (Fig. 1): Group 1, the genus described here as *Notoparmelia*; Group 2 that includes the species of *Parmelia* s. str.; and Group 3 formed by species now grouped under the generic name *Nipponoparmelia*. Groups 1 and 2 belong to the *Parmelia* clade together with *Relicina* and *Relicinopsis* while Group 3 (*Nipponoparmelia*) forms a separate clade with unresolved relationships. The three groups show differences in morphological features, both vegetative as reproductive (Table 2).

Nipponoparmelia contains four species with a special type of pseudocyphellae, distinct from those of other *Parmelia* species. Our results indicate that they have spores corresponding to the type S-V of the parmelioid spores, i.e. large spores with medium spore wall thickness (Fig. 3). On the other hand, Groups 1 and 2 are similar in most of the macro-morphological features but in spite to this apparent homogeneity, they differ by fine morphological details, especially the spore type and ascoma anatomy. The size range of their spores overlaps, however they differ in the thickness of the spore wall (Fig. 3). Group 2 (*Parmelia* s. str.) has spores of type S-III and S-IV, medium to very

large with spore walls more than 1 μm thick while Group 1 (*Notoparmelia*) has spores of type S-II, medium-sized spores, but the spore wall has medium thickness with less than 1 μm , (except *N. crambidiocarpa* with type S-III).

The main distinctive, previously overlooked, character that distinguish Group 1 species (*Notoparmelia*) is the internal structure of the apothecia (Fig. 2). Hale (1987) noted that they have large apothecia with disc splitting radially with the age, and usually broken and inward folded margin (Fig. 4), but the reason for these features was never investigated. Here we offer the hypothesis that these features should be the consequence of the internal structure of the apothecium. As shown in the results, the proper exciple of *Notoparmelia* is formed exclusively by the thick cupulate hyaline layer, composed of large hyphae without prevalent orientation and embedded in a polysaccharide matrix. This is a unique feature, exceptional in *Parmeliaceae* (although present also in the unrelated genus *Platismatia*). The proper exciple of the apothecium lacks the intermediate layer and cortex-like structure between the hyaline and algal layers characteristic of all other *Parmeliaceae*. The cortex-like basal structure of the proper exciple is thought to function as a supportive and protective tissue because its composition similar to the cortical tissue. It is formed by short branched and interconnected hyphae that probably function as skeleton. The abundant hydrophilic polysaccharide matrix where the hyphae are embedded may allow maintenance of the integrity of the structure during the changing hydration states of the apothecia. In *Notoparmelia* the hyphae of the hyaline layer do not show any clear organization: they are long and unbranched and seem to connect directly the subhymenium to the medulla. Why these species present such a difference in the organization of the proper exciple is unknown.

Moreover, the geographical areas of the three groups are different. *Nipponoparmelia* is distributed in East Asia. *Notoparmelia* is restricted to the southern hemisphere, with the centre of distribution in Australia and New Zealand, two species also from South America (*N. cunninghamii* and *N. protosulcata*), and one also widespread in Southeast Asia (*N. erumpens*). It should be noted, that these three more extended species are sorediate. *Parmelia* s. str. is centred in boreal-temperate northern hemisphere areas, although some species are world-wide distributed (Hale 1989, Crespo *et al.* 2004).

The structure of the proper exciple is an important character for *Parmeliaceae* (Crespo *et al.* 2010a, Divakar *et al.* 2010) that has been neglected in systematic studies due to the frequent absence of ascomata in samples. Our results corroborate the segregation of *Nipponoparmelia* based on molecular and morphological vegetative data (Crespo *et al.* 2010b), and indicate that the two monophyletic groups formed by

Parmelia species in the *Parmelia* clade clearly differ in anatomical characteristics of the proper exciple, spore type and geography. Based on these correlated features, we propose to segregate *Parmelia* into two genera. Since the type species (*P. saxatilis*) is included in Group 2, this group is considered as *Parmelia* s. str. and the other group (Australasian Group 1) is described as a new genus *Notoparmelia*. The new genus forms two monophyletic groups (Crespo *et al.* 2010b) which correlate with two main species complexes. *Notoparmelia testacea* complex is represented by *N. subtestacea* and *N. crambidiocarpa*, and the *N. signifera* complex by *N. signifera*, *N. cunninghamii* and *N. tenuirima* (Fig. 1). More extensive sampling including other species is required to confirm that the molecular based phylogenetic topology parallels to morphological traits, refine the species concept in this genus and confirm the position of all mentioned species within this genus.

Taxonomy

Notoparmelia A. Crespo & Divakar **gen. nov.**

MycoBank no. MB

Diagnosis

Thallus foliosus, laxis vel modice adnatus, lobis 2.0–7.0 mm latus, apices rotundatae. Pseudocyphellae effigurateae. Rizinis squarrosus ramosis. Apothecia substipitata vel stipitata, diducens radialiter aetas, excipulum proprium cupulatum, 1-stratoso hyalinum, ascospores ellipsoideae, sporarum murus minum 1µm. Australasiae distributio.

Type species

Notoparmelia signifera (Fig. 4)

Etymology

The epithet refers to Southern Hemisphere distribution (*nōto-* in Greek means southern, south-), species superficially resembles to the *Parmelia*.

Description

Thallus foliose, adnate to loosely adnate, irregularly lobate. Lobes flat, narrow, sublinear to subirregular; apices rounded, lacking cilia. Upper surface, whitish to mineral grey, greenish

grey to y to grey green, sometimes with brownish tips of the lobes, the pseudocyphellae usually effigurate, sometimes fusing into the continuous white rim around the lobe margins, with or without soredia and isidia. Medulla white, loosely packed. Lower surface flat, smooth, black or black with brown papillate marginal zone. Rhizines short, squarrosely branched. *Ascomata* apothecial, laminal, substipitate to stipitate; disc imperforate or rarely perforate, concave, dark to pale brown, splitting radially with the age; thalline margin usually pseudocyphellate; cupulate proper exciple consisting of hyaline layer, (30-) 40 - 60 (-70) μm thick surrounded by continuous algal layer (Fig. 1C, E). *Asci* elongate, clavate, Lecanora-type, apically thickened, without an internal apical beak, 8-spored. *Ascospores* of type S-II, rarely type S-III; medium to large, broadly ellipsoid to ellipsoid, (11-)11.5-15.5(-18) \times (7-)7.5-10(-12) μm ; spore wall thin to medium, (400-)600-700(-1200) nm. Conidiomata pycnidial, immersed, laminal. *Conidia* cylindrical to weakly bifusiform (5-)5.5-7 \times 1 μm long.

Chemistry: Cortex containing atranorin and chloratranorin; medulla containing orcinol depsidones (lobaric acid), β -orcinol depsidones (salazinic, consalazinic, protocetraric and fumarprotocetraric acids), aliphatic acids (protolichesterinic acid), echinocarpic acid and unidentified fatty acid.

Remarks

Notoparmelia is characterized by the following combination of characters: sublinear to subirregular lobes with rounded apices, short, squarrose rhizines, substipitate to stipitate large apothecia usually splitting radially with age and in having proper exciple composed only by one layer without stratification (stratified proper exciple in *Parmelia* s. str. with the basal cortex-like structure) and medium to large broadly ellipsoid ascospores ranging from (11-)11.5-16.5(-18) \times (7-)7.5-10(-12) μm with thin to medium walls, less than 1 μm (more than 1 μm in *Parmelia* s. str.). The genus includes 17 species that grow on bark and rocks in southern and eastern Australia, Tasmania and New Zealand. Two species (*N. cunninghamii*, *N. protosulcata*) also occur in South America and one species (*N. erumpens*) also occurs in South Africa and is more widespread in east Asia. One species (*N. asiatica*) is known only from China. This new genus is only known from the Southern Hemisphere.

New combinations

We made the following 17 new combinations:

Notoparmelia asiatica (A. Crespo & Divakar) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia asiatica A. Crespo & Divakar, *Phytotaxa* **18**, 94 (2011)

Notoparmelia crambidiocarpa (Zahlbr.) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia crambidiocarpa Zahlbruckner, *Lichenes Novae Zelandiae* **104**, 109 (1941)

Notoparmelia crowii (Elix) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia crowii Elix, *Mycotaxon* **47**, 116 (1993a)

Notoparmelia cunninghamii (Crombie) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia cunninghamii Crombie, *Journal of the Linnean Society of London* **15**, 228 (1876)

Parmelia brownii Dodge, *Nova Hedwigia* **19**, 449 (1970)

Notoparmelia erumpens (Kurokawa) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia tenuirima f. *corallina* Müller Argoviensis, *Flora* **66**, 46 (1883)

Parmelia erumpens Kurokawa, *Journal of Japanese Botany* **44**, no.74 (1969)

Notoparmelia norcrambidiocarpa (Hale) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia norcrambidiocarpa Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **66**, 31 (1987)

Notoparmelia nortestacea (Elix) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia nortestacea Elix, *Bibliotheca Lichenologica* **95**, 203 (2007)

Notoparmelia novae-zelandiae (Hale) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia novae-zelandiae Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **66**, 31 (1987)

Notoparmelia queenslandensis (Hale) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia queenslandensis Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **66**, 36 (1987)

Notoparmelia protosulcata (Hale) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia protosulcata Hale, *Mycotaxon* **16**, 162 (1982)

Notoparmelia pseudotenuirima (Gyel.) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia tenuirima f. *isidiosa* Müller Argoviensis, *Bulletin Herbar Bossier* **4**, 90 (1896)

Parmelia pseudotenuirima Gyelnik, *Specierum Novarum Regni Vegetabilis* **29**, 289 (1931)

Notoparmelia salcrambidiocarpa (Hale) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia salcrambidiocarpa Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **66**, 38 (1987)

Notoparmelia signifera (Nyl.) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia signifera Nylander, *Lichenes Novae Zelandiae*, 25 (1888)

Parmelia saxatilis f. *signifera* (Nyl.) Müller Argoviensis, *Compte-Rendu Société Royale Belgique* **31**, 30 (1892)

Notoparmelia subtestacea (Hale) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia subtestacea Hale, *Smithsonian Contr. Bot.* **66**, 45 (1987)

Notoparmelia tarkinensis (Elix & Kantvillas) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia tarkinensis Elix & Kantvillas, *Pap. Proc. R. Soc. Tasm.* **129**, 65 (1995)

Notoparmelia tenuirima (Hooker & Taylor) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia tenuirima Hooker & Taylor, *Hooker's London Journal of Botany* **3**, 645 (1844)

Parmelia tenuiscypha Taylor, *Hooker's London Journal of Botany* **6**, 175 (1847)

Aspidelia beckettii Stirton, *Transactions of the New Zealand Institute* **32**, 81 (1900)

Parmelia tenuirima var. *platyna* Zahlbruckner, *Lichenes Novae Zelandiae* **104**, 108 (1941)

Notoparmelia testacea (Stirton) A. Crespo, Ferencova & Divakar **comb. nov.**

MycoBank no. MB

Parmelia testacea Stirton, *Scottish Naturalist* **4**, 203 (1877-1878)

Parmelia tenuirima * *P. rudior* Nylander, *Lichenes Novae Zelandiae*, 25 (1888)

Parmelia tenuirima Hooker & Taylor var. *erimis* Nylander, *Lichenes Novae Zelandiae*, 25 (1888)

Parmelia rudior (Nyl.) Zahlbruckner, *Catalogus lichenum universalis* **6**, 198 (1929)

Parmelia erimis (Nyl.) Hillmann, *Hedwigia* **78**, 259 (1939)

Parmelia signifera f. *pallidior* Zahlbruckner, *Lichenes Novae Zelandiae* **104**, 107 (1941)

Notoparmelia

This newly discovered genus includes a group of Australasian species previously placed in *Parmelia* s. str. (Hale 1987) that differs morphologically from other species in this genus by having thinner spore walls and proper exciple reduced to one layer, composed exclusively by large hyphae without branching pattern embedded in abundant polysaccharide matrix. The proper exciple is surrounded by a continuous algal layer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by the institutional support of UCM-Banco Santander to research group SYSTEMOL and by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (CGL2010-21646), to which Z.F. is also thanked for the FPU grant (CGL2007- 64652).

REFERENCES

- Acharius, E. (1803) *Methodus qua Omnes Detectos Lichenes*. Stockholm: F. D. D. Ulrich.
- Amo de Paz, G., Lumbsch, T. H., Cubas, P., Elix, J. A. & Crespo, A. (2010) The morphologically deviating genera *Omphalodiella* and *Placoparmelia* belong to *Xanthoparmelia* (*Parmeliaceae*). *Bryologist* **113**(2): 376-386.
- Blanco, O., Crespo, A., Elix, J.A., Hawksworth, D.L. & Lumbsch, H.T. (2004a). A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* **53**(4): 959-975.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P. K., Esslinger, T. L., Hawksworth, D. L. & Lumbsch, H. T. (2004b) *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (*Parmeliaceae*) based on molecular and morphological data. *Mycological Research* **108**: 873–884.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P.K., Elix, J.A. & Lumbsch, H.T. (2005) Molecular phylogeny of parmotreoid lichens (Ascomycota, *Parmeliaceae*). *Mycologia* **97**(1): 150-159.
- Blanco, O., Crespo, A., Ree, R. H. & Lumbsch, H. T. (2006) Major clades of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**: 52-69.
- Calvelo, S. & Adler, M.T. (1999) *Parmelia araucana* sp. nov. and new reports in the *Parmeliaceae* sensu stricto (lichenized Ascomycotina) from Patagonia and Tierra del Fuego (Argentina). *Sydowia* **51**(2): 145-154.
- Crespo, A., Divakar, P.K. & Hawksworth, D.L. (2011) Generic concepts in parmelioid lichens, and the phylogenetic value of characters used in their circumscription. *The Lichenologist* **43**(6): 1-25.
- Crespo, A., Lumbsch, H.T., Mattsson, J.-E., Blanco, O., Divakar, P.K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan, P.A. & Wedin, M. (2007) Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**(2): 812-824.
- Crespo, A., Ferencova, Z., Perez-Ortega, S., Elix, J.A. & Divakar, P.K. (2010a) *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota). *Systematics and Biodiversity* **8**(2): 209-221.
- Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P.K., del Prado, R., Perez-Ortega, S., de Paz, G.A., Ferencova, Z., Blanco, O., Roca-Valiente, B., Nunez-Zapata, J., Cubas, P., Argüello, A., Elix, J.A., Esslinger, T.L., Hawksworth, D.L., Millanes, A., Molina, M.C., Wedin, M., Ahti, T., Aptroot, A., Barreno, E., Bungartz, F., Calvelo, S., Candan, M., Cole, M., Ertz, D., Goffinet, B., Lindblom, L., Lücking, R., Lutzoni, F., Mattsson, J.-E., Messuti, M.I., Miadlikowska, J., Piercey-Normore, M., Rico, V.J., Sipman,

- H.J.M., Schmitt, I., Spribille, T., Thell, A., Thor, G., Upreti, D.K. & Lumbsch, H.T. (2010b) Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* **59**(6): 1735-1753.
- Crombie, J.M. (1876) On the Lichens Collected by Prof. R.O. Cunningham. *Journal of the Linnean Society of London* **15**, 222-234.
- Culberson, W. L. & Culberson, C. F. (1981) The genera *Cetrariastrum* and *Concarnmerella* (*Parmeliaceae*): a chemosystematic synopsis. *Bryologist* **84**: 273–314.
- del Prado, R., Ferencova, Z., Armas-Crespo, V., de Paz, G.A., Cubas, P. & Crespo, A. (2007) The arachiform vacuolar body: an overlooked shared character in the ascospores of a large monophyletic group within *Parmeliaceae* (*Xanthoparmelia* clade, Lecanorales). *Mycological Research* **111**(6): 685-692.
- Divakar, P. K., Upreti, D.K., Sinha, G.P. & Elix, J.A. (2003) New species and records in the lichen family *Parmeliaceae* (Ascomycota) from India. *Mycotaxon* **88**: 149-154.
- Divakar, P. K., Molina, M.C., Lumbsch, H.T. Crespo, A. (2005) *Parmelia barroenoae*, a new lichen species related to *Parmelia sulcata* (*Parmeliaceae*) based on molecular and morphological data. *Lichenologist* **37**(1): 37-46.
- Divakar, P. K., Crespo, A., Blanco, O. & Lumbsch, H.T. (2006) Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical Hypotrachyna clade of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**(2): 448-458.
- Divakar, P. K., Lumbsch, H.T., Ferencova, Z., del Prado, R. & Crespo, A. (2010) *Remototrachyna*, a newly recognized tropical lineage of lichens in the Hypotrachyna clade (*Parmeliaceae*, Ascomycota), originated in the Indian subcontinent. *American Journal of Botany* **97**(4): 579-590.
- Dodge, C. W. (1970) Lichenological notes on the flora of the Antarctic Continent and the subantarctic islands, IX-XI. *Nova Hedwigia* **19**: 439-502.
- Elix, J. A. (1993a) New species in the lichen family *Parmeliaceae* (Ascomycotina) from Australia. *Mycotaxon* **47**: 101-129.
- Elix, J. A. (1993b) Progress in generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (Ascomycotina: *Parmeliaceae*) and a synoptic key to the *Parmeliaceae*. *Bryologist* **96**: 359–383.
- Elix, J. A. (2007) New species in the lichen family *Parmeliaceae* (Ascomycota) from Australasia. *Bibliotheca Lichenologica* **95**: 171-182.
- Elix, J. A., Johnston, J. & Verdon, D. (1986) *Canoparmelia*, *Paraparmelia* and *Relicinopsis*, three new genera in the *Parmeliaceae* (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* **27**: 372–383.

- Elix, J. A. & Hale, M. E. (1987) *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis* and *Parmotremopsis*, five new genera in the *Parmeliaceae* (lichenized *Ascomycotina*). *Mycotaxon* **31**: 491–510.
- Elix, J. A. & Kantvilas, G. (1995) New taxa and new records from the Tasmanian lichen flora. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania* **129**: 63–68.
- Ferencova Z. (2012) Estudio comparativo de los caracteres reproductores en relación con la filogenia de la familia *Parmeliaceae*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Feuerer, T. & Thell, A. (2002) *Parmelia ernstiae* - a new macrolichen from Germany. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg* **30-32**: 49–60.
- Fries, T. M. (1861) *Genera Heterolichenum Europaea Recognita*. Uppsala: Edquist.
- Gyelnik, V. (1931) Additamenta ad cognitionem Parmeliarum. II. *Feddes Repertorium specierum novarum regni vegetabilis* **29**: 273–291.
- Hale, M. E. (1974a) *Bulbothrix*, *Parmelina*, *Relicina*, and *Xanthoparmelia*, four new genera in the *Parmeliaceae* (Lichenes). *Phytologia* **28**: 479–490.
- Hale, M. E. (1974b) Delimitation of the lichen genus *Hypotrachyna* (Vainio) Hale. *Phytologia* **28**: 340–341.
- Hale, M. E. (1976) Synopsis of a new lichen genus *Everniastrum* Hale (*Parmeliaceae*). *Mycotaxon* **3**: 345–353.
- Hale, M. E. (1982) A new species of *Parmelia* (Lichenes) with protocetraric acid. *Mycotaxon* **16**: 162–164.
- Hale, M. E. (1984) *Flavopunctelia*, a new genus in the *Parmeliaceae* (*Ascomycotina*). *Mycotaxon* **20**: 681–682.
- Hale, M. E. (1985) *Xanthomaculina* Hale, a new lichen genus in the *Parmeliaceae* (*Ascomycotina*). *Lichenologist* **17**: 255–265.
- Hale, M. E. (1986a) *Arctoparmelia*, a new genus in the *Parmeliaceae* (*Ascomycotina*). *Mycotaxon* **25**: 251–254.
- Hale, M. E. (1986b) *Flavoparmelia*, a new genus in the lichen family *Parmeliaceae* (*Ascomycotina*). *Mycotaxon* **25**: 603–605.
- Hale, M. E. (1987) A monograph of the lichen genus *Parmelia* Acharius sensu stricto (*Ascomycotina: Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* **66**: 1–55.
- Henssen, A. (1991) *Omphalodiella patagonica*, a new peltate lichen genus and species from South America. *Lichenologist* **23(4)**: 333–342.
- Henssen, A. (1992) *Placoparmelia patagonica*, a new lichen genus and species from Argentina (*Parmeliaceae*). *Lichenologist* **24(2)**: 133–142.
- Hillmann, J. (1939) Bemerkungen über einige Arten der Flechtengattung *Parmelia*. I. *Hedwigia* **78**: 249–267.

- Hooker, J. D. & Taylor, T. (1844) Lichenes Antarctica. *Hooker's London Journal of Botany* **3**: 634-658.
- Kärnefelt, I., Mattsson, J.-E. & Thell, A. (1993) The lichen genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (Parmeliaceae) and their presumed evolutionary affinities. *Bryologist* **96**(3): 394-404.
- Kärnefelt, I., Thell, A., Randle, T. & Saag, A. (1994) The genus *Flavocetraria* Kärnefelt & Thell (Parmeliaceae, Ascomycotina) and its affinities. *Acta Botanica Fennica* **150**: 79-86.
- Krog, H. (1982) *Punctelia*, a new lichen genus in the Parmeliaceae. *Nordic Journal of Botany* **2**: 287-292.
- Kurokawa, S. (1969) A note on some rare lichens of Japan. *Journal of Japanese Botany* **44**: 225-229.
- Kurokawa, S. (1991) *Rimeliella*, a new lichen genus related to *Rimelia* of the Parmeliaceae. *Annals of the Tsukuba Botanical Garden* **10**: 1-14.
- Kurokawa, S. (1994) Japanese species of *Parmelia* Ach. (sens. str.), Parmeliaceae (2). *Journal of Japanese Botany* **69**: 121-126.
- Lumbsch, H.T., Ahti, T., Altermann, S., Amo de Paz, G. *et al.* (2011) One hundred new species of lichenized fungi: a signature of undiscovered global diversity. *Phytotaxa* **18**: 1-127.
- Molina, M.C., Crespo, A., Blanco, O., Lumbsch, H.T. & Hawksworth, D.L. (2004) Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia* s. str. (Parmeliaceae) inferred from nuclear ITS rDNA and beta-tubulin sequences. *Lichenologist* **36**(1): 37-54.
- Molina, M.C., del Prado, R., Divakar, P.K., Sánchez-Mata, D. & Crespo, A. (2011a) Another example of cryptic diversity in lichen-forming fungi: The new species *Parmelia mayi* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Organisms Diversity and Evolution* **11**(5): 331-342.
- Molina, M.C., Divakar, P.K., Millanes, A.M., Sánchez, E., del Prado, R., Hawksworth, D.L. & Crespo, A. (2011b): *Parmelia sulcata* (Ascomycota: Parmeliaceae), a sympatric monophyletic species complex. *Lichenologist* **43**(6): 585-601.
- Müller Argoviensis, J. (1883) Lichenologische Beiträge, XVII. *Flora* **66**: 45-48.
- Müller Argoviensis, J. (1892) Lichenes Knightiani, in Nova Zelandia lecti additis nonnullis aliis ejusdem regionis, quos exponit. *Compte-Rendu Société Royale Belgique* **31**: 22-42.
- Müller Argoviensis, J. (1896) Analecta australienses. *Bulletin Herbier Bossier* **4**: 87-96.
- Nylander, W. (1888) Lichenes Novae Zelandiae. Paris. 156 pp.
- Stirton, I. (1877-1878) On Certain Lichens Belonging to the Genus *Parmelia*. *Scottish Naturalist* **4**: 200-203.

- Stirton, I. (1900) On New Lichens from Australia and New Zealand. *Transactions of the New Zealand Institute* **32**: 70-82.
- Taylor, T. (1847) New Lichens, Principally from the Herbarium of W.J. Hooker. *Hooker's London Journal of Botany*, **6**: 148-197.
- Thell, A., Feuerer, T., Elix, J. A. & Kärnefelt, I. (2006) A contribution to the phylogeny and taxonomy of *Xanthoparmelia* (Ascomycota, *Parmeliaceae*). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **100**: 797– 807.
- Wirtz, N., Printzen, C., Sancho, L.G. & Lumbsch, H.T. (2006) The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (*Parmeliaceae*, Ascomycota) revisited. *Taxon* **55(2)**: 367-376.
- Zahlbruckner, A. (1929) *Catalogus Lichenum Universalis*. Vol.6. Leipzig. 480 pp.
- Zahlbruckner, A. (1941) *Lichenes Novae Zelandiae a cl. H.H. Allan eiusque collaboratoribus lecti. Denkschriften der Akademie Wissenschaft Wien, Mathematisch-naturliche Klasse* **104**: 249-380.

Table 1. Fertile specimens used in this study, with their location and collection details.

Species	Voucher specimens	Locality	Collector (s)
<i>Nipponoparmelia laevior</i>	MAF-Lich 7278	Japan: Hokkaido	H. Harada
<i>N. ricasolioides</i>	MAF-Lich 15526	China: Yunnan: Jian Chuan Co.	A. Crespo <i>et al.</i>
<i>Notoparmelia crambidiocarpa</i>	MAF-Lich 4965	New Zealand: South Island: West Coast	H.A. Imshaug
<i>N. erumpens</i>	MAF-Lich 7529	Australia: Australian Capital Territory	M.C. Molina & J.A. Elix
<i>N. erumpens</i>	MAF-Lich 7576	Australia: New South Wales	M.C. Molina & J.A. Elix
<i>N. signifera</i>	MAF-Lich 7545	Australia: Australian Capital Territory	M.C. Molina & J.A. Elix
<i>N. subtestacea</i>	MAF-Lich 17026	New Zealand: South Island: Otago	A. Knight
<i>N. tenuirima</i>	MAF-Lich 17027	New Zealand: South Island: Southland	A. Knight
<i>N. tenuirima</i>	MAF-Lich 7663	New Zealand: South Island: West Coast	M.E. Hale
<i>Parmelia adaugescens</i>	MAF-Lich 7277	Japan: Hokkaido	H. Harada
<i>P. adaugescens</i>	MAF-Lich 9870	Japan: Hokkaido	H. Harada
<i>P. cochleata</i>	MAF-Lich 7280	Japan: Hokkaido	H. Harada
<i>P. cochleata</i>	MAF-Lich 9880	Japan: Hokkaido	H. Harada
<i>P. fertilis</i>	MAF-Lich 9871	Japan: Hokkaido	H. Harada
<i>P. omphalodes</i>	MAF-Lich 6798	Spain: Madrid	A. Crespo
<i>P. omphalodes</i>	MAF-Lich 15485	Spain: Zamora	A. Crespo & O. Blanco
<i>P. saxatilis</i>	MAF-Lich 12518	Spain: La Rioja	A. Crespo <i>et al.</i>
<i>P. saxatilis</i>	MAF-Lich 11541	Spain: Cadiz	A. Crespo <i>et al.</i>
<i>P. sulcata</i>	MAF-Lich 13883	Spain: Madrid	A. Crespo
<i>P. sulcata</i>	MAF-Lich 15421	Ireland: Kerry Dunkerron	A. Crespo <i>et al.</i>
<i>Parmelina quercina</i>	MAF-Lich 13949	Spain: La Rioja	A. Crespo <i>et al.</i>
<i>Relicina limbata</i>	MAF-Lich 10504	Australia: New South Wales	J.A. Elix
<i>Relicinopsis intertexta</i>	MAF-Lich 15372	Thailandia: Nakhon Nayok	W.Polyiam
<i>R. rahegensis</i>	MAF-Lich 15373	Thailandia: Nakhon Nayok	W.Polyiam

Table 2. Major diagnostic characters and geography of *Notoparmelia*, *Parmelia* s. str. and *Nipponoparmelia*

Character	<i>Notoparmelia</i> (Group I)	<i>Parmelia</i> s.str. (Group II)	<i>Nipponoparmelia</i> (Group III)
Lobes	sublinear to subirregular	sublinear	sublinear
Pseudocyphellae	effigurate laminal or/and marginak fusing and forming white rim	Effigurate laminal	small, punctate, at lobe edges
Rhizines	simple to squarrosely branched	simple to furcate and squarrosely branched	simple to furcate
Apothecium type (Ferencova <i>et al.</i> in prep.)	A-V, stipitate to substipitate, large, splitting radially with age	A-II and A-III, substipitate	A-III, substipitate
Proper exciple structure	1-layered: thick hyaline layer (30-70 μm)	3-layered: thin to thick hyaline layer thin intermediate layer cortex-like basal layer	3-layered: thin to thick hyaline layer thin intermediate layer cortex-like basal layer
Spore type (Ferencova <i>et al.</i> in prep.)	S-II (one species with type S-III)	S-III and S-IV (also two species with type S-I; Hale 1987)	S-V
Ascospore size	Medium (except large in one species) 11.5-18.0 $\mu\text{m} \times 7.5$ -12.0 μm	medium to very large 12.0-23.5 $\mu\text{m} \times 6.5$ -15.5 μm	large to very large 17.0-20.5 $\mu\text{m} \times 7.5$ -13.0 μm
Thickness of the spore wall	< 1 μm (except <i>N. crambidiocarpa</i> ~ 1 μm)	> 1 μm	< 1 μm
Distribution	Australasia (two species also in South America)	Boreal-temperate Northern Hemisphere	East Asia

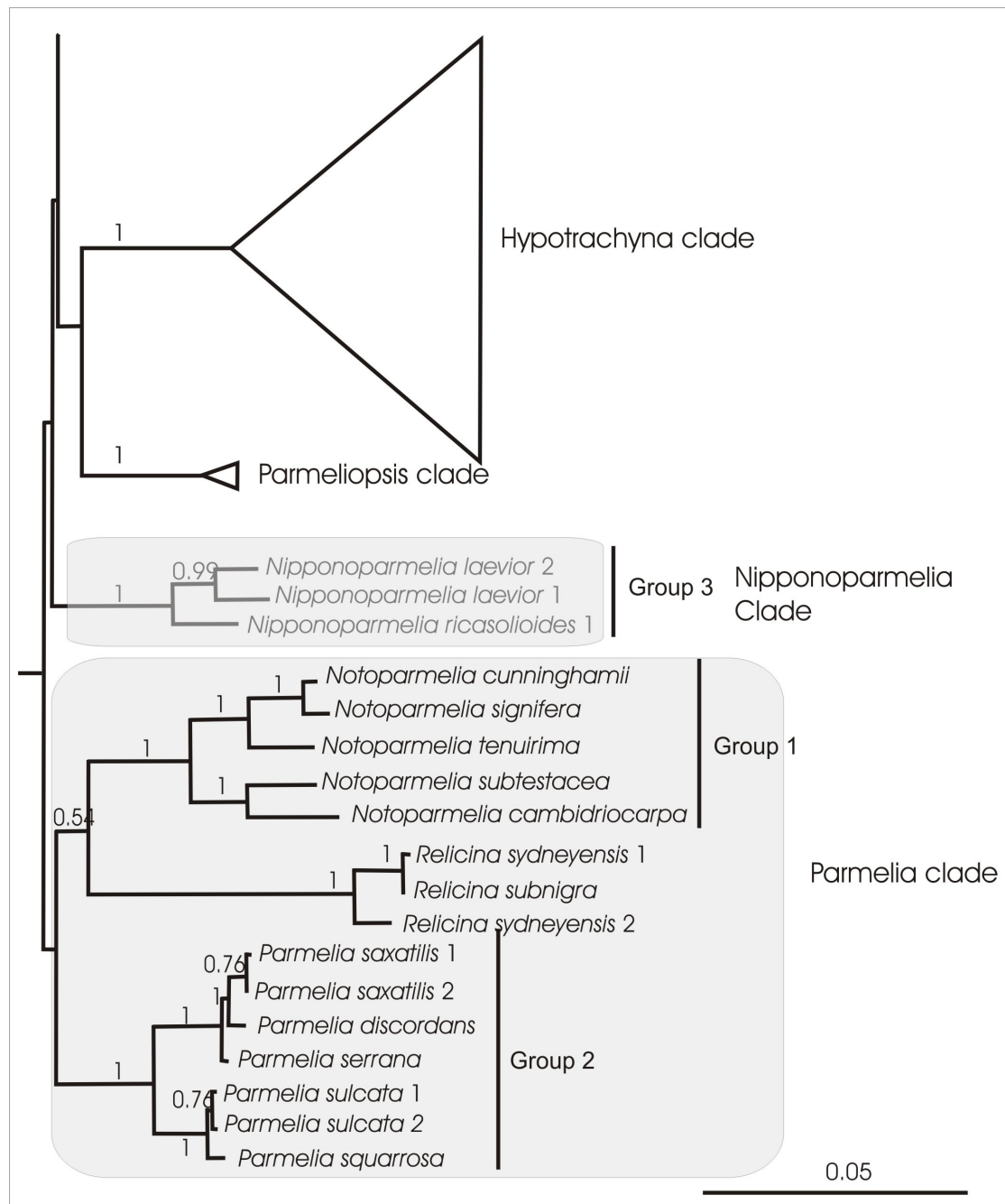


Fig. 1. Simplified phylogenetic tree showing the two major clades of parmelioid lichens, clade *Parmelia* and clade *Nipponoparmelia*, and the phylogenetic relationships of three groups previously included in genus *Parmelia*. (Based on Fig. 1 in Crespo *et al.* 2010b. Phylogram obtained from a Maximum likelihood analysis of the 3GENE dataset, showing the phylogenetic relationships among *Parmeliaceae*.)

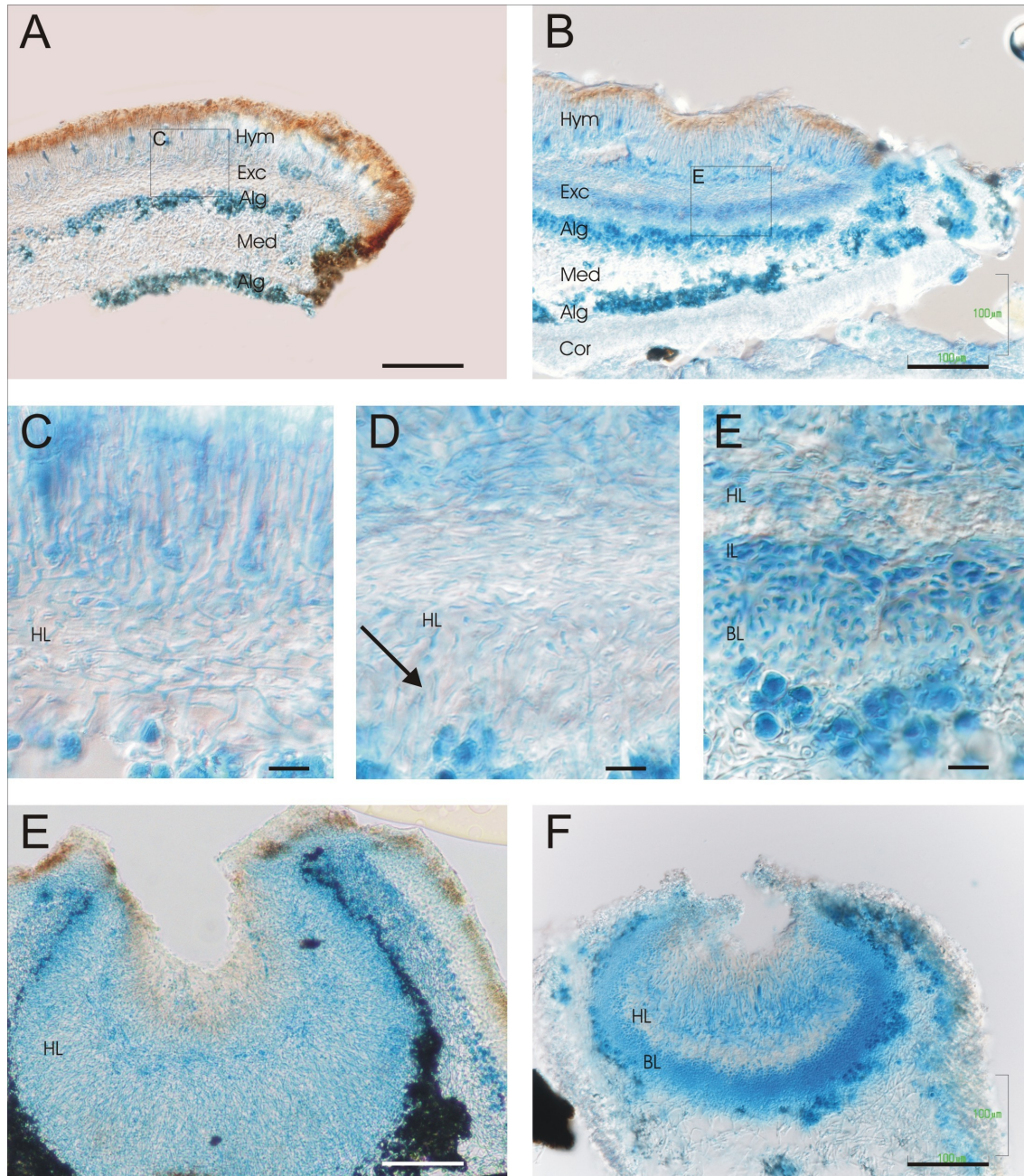


Fig. 2. A-E. Exciple anatomy of *Notoparmelia* and *Parmelia* s. str.. **A & C.** *Notoparmelia signifera*; **B & D.** *Parmelia sulcata*; **A & B.** Overviews of cross section through apothecium; **C - E.** Details showing type of tissue in the cupulate proper exciple. **F & G.** Early ontogenic stages of the apothecium. Details showing tissues in the cupulate proper exciple. **F.** *Notoparmelia tenuirima*; **G.** *Parmelina quercina*. Bars = 100 µm in A, B, F, G; 10 µm in C - E. Alg = algal layer, Exc = cupulate proper exciple composed of hyaline layer (HL), intermediate layer (IL) and cortex-like basal layer (BL), Hym = hymenium, Med = medulla

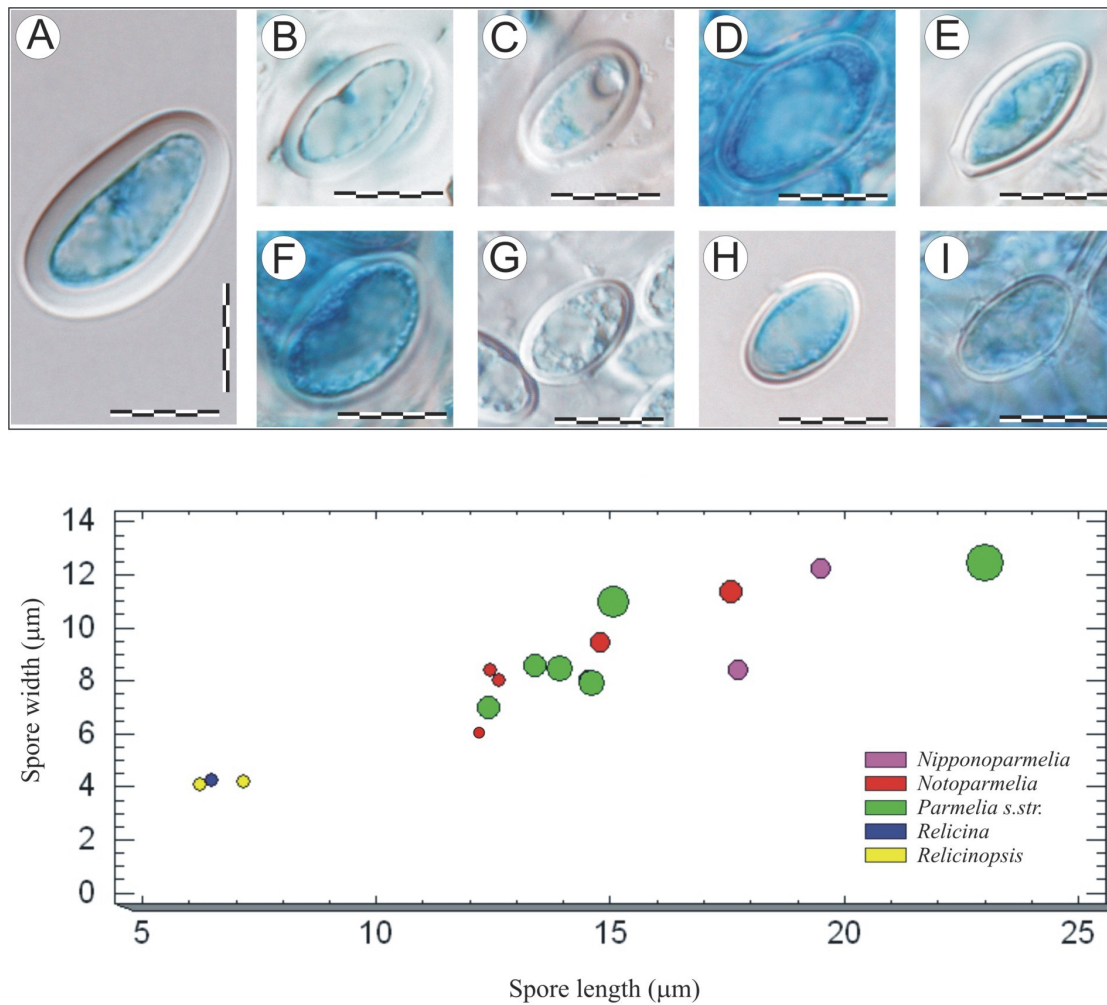


Fig. 3. Morphology of the spores. The relation between spore length and spore width in the species belonging to clades *Parmelia* and *Nipponoparmelia* is shown in the box below. The diameter of the circle reflects the relative thickness of the spore wall. **A - C.** *Parmelia* s. str. **A.** *P. adaugescens* **B.** *P. saxatilis* **C.** *P. sulcata* **D - E.** *Nipponoparmelia* **D.** *N. ricassolioides* **E.** *N. laevior* **F - I.** *Notoparmelia* **F.** *N. crambidiocarpa* **G.** *N. signifera* **H.** *N. subtestacea* **I.** *N. erumpens*; Bar = 10 μm



Fig. 4. *Notoparmelina signifera*. **A.** Habit. Bar = 1 cm

Capítulo VI

**A discussion about reproductive modes of *Pseudevernia
furfuracea* based on phylogenetic data**

Publicado en *Lichenologist* 42(4): 449-460 (2010)

RESUMEN

Una discusión sobre los modos de reproducción de *Pseudevernia furfuracea* basada en datos filogenéticos

Se describen dos estrategias de reproducción asexual del liquen común *Pseudevernia furfuracea*. Aunque esta especie se propaga principalmente por isidios, algunos ejemplares muestran además desarrollo de soralios. Se realizaron análisis morfológicos, químicos y moleculares en tres de estos ejemplares sorediados procedentes de las Islas Canarias, Marruecos y Turquía. Los análisis de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y Bayesiano indican que: (a) las muestras sorediadas representan sólo una variante morfológica del modo reproductivo y (b) no es apropiada la separación de los taxones (a nivel de especies o menor) sobre la base de su contenido ya sea en ácido olivetórico o en ácidos fisódico y oxifisódico. Además, se presenta por primera vez una reconstrucción filogenética del género *Pseudevernia*. El árbol muestra dos clados monofiléticos hermanos, uno con especies americanas (*P. intensa*, *P. cladonia*, *P. consocians*), y el segundo con las muestras de *P. furfuracea* (incluyendo los especímenes sorediados). Se discute la importancia biológica y taxonómica de los soralios en las muestras sorediadas.

A discussion about reproductive modes of *Pseudevernia furfuracea* based on phylogenetic data

Zuzana FERENCOVA, Ruth DEL PRADO,
Israel PÉREZ-VARGAS, Consuelo HERNÁNDEZ-PADRÓN and
Ana CRESPO

Abstract: Two asexual reproductive strategies of the common lichen *Pseudevernia furfuracea* are described. Although the species propagates mainly by isidia, some specimens also show the development of soralia. Morphological, chemical and molecular analyses were performed on three such sorediate specimens from the Canary Islands, Morocco and Turkey. Maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian analyses indicate that: a) sorediate samples represent only a morphological variant of the reproductive mode and b) the separation of taxa (at species level or below) on the basis of their containing either olivetoric acid or physodic and oxyphysodic acids is not appropriate. In addition, a phylogenetic reconstruction of the genus *Pseudevernia* is presented for the first time. The tree shows two sister monophyletic clades, one containing American species (*P. intensa*, *P. cladonia*, *P. consocians*), and the second encompassing the *P. furfuracea* samples (including sorediate specimens). The biological and taxonomic significance of soralia in sorediate samples is discussed.

Keywords: isidia, lichens, *Parmeliaceae*, soredia, species pairs, vegetative modes

Introduction

Lichens are stable symbiotic organisms in which only the fungal partner is able to carry out sexual reproduction. The development of special dispersal structures containing both symbionts, such as soredia or isidia, together with thallus fragmentation, allow the efficient propagation of the symbiotic dual organism. Soredia have been interpreted as being vegetative propagules selected during the evolutionary history of lichens (Poelt 1970, 1972) and have been accorded significant status as taxonomic characters. Earlier investigations defined ‘species pairs’ in lichens as two species, one

fertile without vegetative propagules (primary species) and the other with soredia or isidia (secondary species); the latter being derived from the former. Hale (1965) presumed in his work on *Parmelia* (subgenus *Amphigymnia*) that sorediate species evolved from either isidiate or nonsorediate–nonisidiate ancestors, naming the two or three taxa involved ‘counterparts’.

The classic interpretation among lichenologists supports taxonomic separation at the species level for both members of a species pair. However, studies based on morphological and ecological information (Tehler 1982) or phylogenetic analysis (Lohtander *et al.* 1998a, b; Myllys *et al.* 1999, 2001; Articus *et al.* 2002; Molina *et al.* 2002; Cubero *et al.* 2004; Buschbom & Mueller 2006) show, at least for sorediate/nonsorediate species pairs, that these forms do not separate into monophyletic lineages. Consequently, pairs have been interpreted as representing two dispersal strategies and the specific status of each member of the pair has not been corroborated. Few cases of isidiate/

Z. Ferencova, R. Del Prado and A. Crespo (corresponding author): Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.

Email: acrespo@farm.ucm.es

I. Pérez-Vargas and C. Hernández-Padrón: Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, E-38071, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain.

DISCUSIÓN GENERAL

Cada vez se pone más de relieve la importancia de los estudios comparativos de anatomía, ultraestructura y ontogenia en la moderna era molecular en la liquenología. Porque son los caracteres moleculares los que están aceptados universalmente en biología para la reconstrucción filogenética y para la delimitación de los linajes monofiléticos. Son ellos, los que permiten el chequeo del valor filogenético de distintos caracteres a nivel del género. Pero la necesidad de los estudios sistemáticos y completos de los caracteres morfológicos y anatómicos, previamente rechazados por su homoplasia en los niveles taxonómicos superiores, queda mostrada en el presente trabajo, con el grupo parmeliode de la familia *Parmeliaceae* como el objeto principal.

En este trabajo se discute y evalúa el valor taxonómico y filogenético de los caracteres reproductivos. Es un estudio comparativo basado principalmente en las especies del clado parmeliode de la familia *Parmeliaceae*, pero evaluando y comparando los mismos caracteres en otros representantes de la misma familia, y con mucho hincapié en el género más desviante de la familia, *Protoparmelia*.

El valor y uso de los caracteres en la sistemática de los líquenes

Los hongos liquenizados hay que considerarlos como un grupo heterogéneo, que se originó en varias ocasiones independientemente y donde cada carácter ha podido evolucionar independiente en varios linajes no relacionados. La historia evolutiva de los ascomicetes liquenizados ha llevado al desarrollo de caracteres homoplásicos. La evolución de los distintos caracteres en distintos grupos ha podido originar múltiples convergencias en caracteres selectos, por lo que si construimos clasificaciones basadas en estos caracteres estableceremos grupos polifiléticos en la mayoría de los casos.

Con el creciente número de estudios filogenéticos basados en datos moleculares se muestra, que hasta ahora no conocemos ningún carácter universal que pudiera servir para la clasificación en grupos naturales de los hongos liquenizados. En los hongos lecanoromicetes ocurren gran número de paralelismos en los caracteres vegetativos (tipo del talo, tipo de rizinas, presencia de cilios, estructuras de intercambio gaseoso, etc.) igual que en los caracteres generativos (relacionados con el apotecio), ya sea la anatomía de las partes estériles como el excípulo propio, las paráfisis, perforación del disco apotecial o de las partes fértiles como los ascos o las esporas.

El valor taxonómico de los caracteres utilizados hasta ahora ha sido sobreestimado y sólo la combinación de varios caracteres puede ser la clave para describir cada linaje monofilético. Tal como fue apuntado por Lumbsch (1998) para los caracteres químicos, el

carácter por sí sólo no tiene valor taxonómico *a priori*, pero puede ganar en importancia al correlacionarse con otro carácter independientes, lo que solo es posible de evaluar *a posteriori*. El valor filogenético del carácter se debe valorar desde la perspectiva de la co-ocurrencia del carácter en los grupos estudiados (Tibell 1998) donde las especies ancestrales y las especies descendientes son detectados por los caracteres que les unen. Así los caracteres pueden servir en la clasificación de un grupo pero no en otro, donde juega su rol otro carácter. Esto puede descubrirse sólo después de la reconstrucción filogenética a la luz de datos moleculares.

Cada conjunto de caracteres tiene distinto valor a distinto nivel. Así el tipo de las esporas puede ser constante en una familia (las esporas polariloculares son el carácter sinapomórfico en *Teloschistaceae* o las esporas marrones bicelulares en *Physciaceae*) y heterogéneo en otra (*Parmeliaceae* con esporas hialinas unicelulares, marrones septadas). Lo mismo ocurre con el tipo de talo, tipo de asco, número de esporas por asco u otros caracteres utilizados en la clasificación. Por eso es muy importante no atribuir en general más importancia a un conjunto de caracteres que a otro sino que hay que estudiar cada grupo por separado y a la luz de los datos moleculares describir los grupos monofiléticos con los caracteres lo mas sinapomorficos posible *a posteriori*.

Lo mismo ocurre a nivel de los géneros. Un carácter que discrimina rigurosamente un género puede presentar mucha variabilidad en otro género y así no ser informativo en este (su estado es sinapomórfico en el primer grupo pero el carácter es homoplásico en los niveles taxonómicos superiores). Eso no quiere decir, que este carácter no sirve, sino que hay que utilizarlo en casos particulares y con precaución, sin extrapolar los resultados a otros grupos aunque sean grupos hermanos. No puede servir de carácter predictivo *a priori*, sino solo como carácter discriminante *a posteriori*. Por eso cada género debería ser estudiado y evaluado por separado y abarcando todas las categorías de caracteres (Printzen 2010), no limitarnos solo a una de ellas. Así con el conjunto de todas las características del género (sexual, vegetativo, química) se puede describir cada uno de ellos y siempre apoyándose en los resultados de los análisis filogenéticos moleculares (Nimis 1998).

Además, nuestros resultados muestran que es muy importante buscar las tendencias de los caracteres estudiados dentro de cada género y no limitarnos a buscar un carácter perfecto que encaje a todas las especies. Casi en todos los aspectos se ha visto que en cada grupo monofilético hay una-dos especies desviantes, donde el carácter típico del grupo no encaja con la característica general. Esto es casi una regla general y no indica que el carácter deba ser rechazado sino al revés, tiene que ser destacado y estudiado, porque esa especie desviante podría ser la clave de los estudios sobre la evolución de dicho carácter. Podría representar un linaje no favorecido o al revés, un linaje nuevo aún no explotado.

El caso de *Parmeliaceae*

Actualmente la familia *Parmeliaceae* está entre los grupos de hongos mejor estudiados desde la perspectiva filogenética (Crespo *et al.* 2010) pero ocurre lo mismo que en otros grupos de hongos, existen muy pocos caracteres que puedan ser considerados verdaderamente sinapomórficos. Algunos de estos caracteres que fueron considerados sinapomórficos en parmeliáceos se ha visto repetidamente que no lo son: están presentes en la mayoría de los taxones pero no en todos. Así es el caso de p.ej. (1) la posición laminal de los apotecios y picnidos en el grupo parmelioides, con la excepción de *Cetrelia* y algunas especies de *Parmotrema* (Blanco *et al.* 2004b, 2005), (2) la posición marginal de los apotecios y picnidios en el grupo cetrarioide, con la excepción de *Melanelia stygia* (Crespo *et al.* 2007, 2010), (3) la presencia de las esporas hialinas, simples en *Parmeliaceae*, con la excepción de *Anzia*, *Oropogon* y *Sulcaria* (Crespo *et al.* 2007), (4) la presencia de ascos octosporales en *Parmeliaceae* con la excepción de *Oropogon*, *Sulcaria* y *Menegazzia* (Crespo *et al.* 2007). Aparentemente el carácter ancestral más importante de la familia *Parmeliaceae* es la estructura del apotecio parmeliáceo con la presencia del excípulo propio cupulado (cerrado en su base y rodeado por la capa algal) debida al desarrollo supraalgal del apotecio (**Capítulo I**).

Lo más común es que cada linaje monofilético esté caracterizado por la combinación de unos pocos caracteres morfológicos, anatómicos, químicos, ecológicos y/o biogeográficos. Se ha visto repetidamente que la mayoría de estos caracteres son homoplásicos y los grupos basados en ellos resultan polifiléticos (Blanco *et al.* 2004, 2005; Divakar *et al.* 2006; Crespo *et al.* 2007). Aunque alguno de los caracteres puede ser típico para todo un género, en otro género (aunque sea grupo hermano) puede ocurrir esporádicamente en alguna o varias especies, sin tener importancia a nivel del género. El valor de cada carácter tiene que evaluarse en distintos grupos por separado, no es aconsejable simplemente extrapolar los resultados de un grupo a otro, estudiar su especie tipo y definir el grupo a base de ello. Cada grupo monofilético puede estar caracterizado por diferentes caracteres sinapomórficos o por un conjunto de caracteres homoplásicos.

Los caracteres generativos, tan habitualmente utilizados en la taxonomía de otros hongos, se han empleado comúnmente solo en el caso de los líquenes crustáceos y otros microlíquenes. Sin embargo en los grupos foliáceos se han utilizado con menos frecuencia porque se consideraron bastante uniformes (Hale 1984, Hafellner 1994). En los parmeliáceos han sido aún más infrautilizados especialmente en el caso de los parmelioides, donde un gran porcentaje de las especies descritas solo se conocen estériles o, al menos, el tipo es estéril (Crespo *et al.* 2011).

No obstante, las parmeliáceas en conjunto se caracterizan fenotípicamente por caracteres ontogenéticos, morfológicos y anatómicos del cuerpo fructífero como son: 1) la

ontogenia supramedular / supraalgal (origen ontogénico en la zona inferior del córtex del talo, por encima de la capa algal; **Capítulo I**), 2) el desarrollo ascohimenial gimnocárpico o hemiangiocárpico (los ascos están organizados en el himenio expuesto, o inicialmente cubierto y luego expuesto) y 3) la presencia de una estructura característica en el apotecio, el excípulo propio cupulado (Henssen & Jahns 1974, **Capítulo I**). La variabilidad en la estructura interna del apotecio parmeliáceo se ha mostrado como un importante y hasta ahora ignorado carácter diagnóstico de nuevos géneros (**Capítulo IV, V**). Las esporas son elipsoidales, unicelulares y hialinas en la mayoría de los géneros por lo que se les ha atribuido un valor filogenético limitado pero se ha observado variabilidad en el tamaño, en el grosor de la pared y en el contenido interno entre distintos grupos o entre distintas especies de un género. Esta variabilidad puede en algunos casos facilitar la resolución de problemas taxonómicos y evolutivos dentro de la familia (**Capítulos II, III, IV, V**). Los parmeliáceos presentan diferentes estructuras reproductoras. La presencia de las estructuras reproductoras asexuales fue utilizada como carácter taxonómico a nivel de especie. La presencia de los tres diferentes modos de reproducción (apotecios, isidios, soredios) en un sólo espécimen demuestra que el concepto de especie basado en estas estructuras debería replantearse a la luz de datos moleculares (**Capítulo VI**).

Estructura interna del apotecio, excípulo propio

Nuestros resultados muestran, que los apotecios con un excípulo propio compuesto por capa hialina, capa intermedia y una estructura basal de apariencia cortical son típicos de las especies de la familia *Parmeliaceae* y no se conocen en ningún otro grupo. Los parmeliáceos presentan variabilidad en el excípulo propio, pudiendo distinguirse varios tipos en función de las anchuras relativas de las capas que lo forman. La orientación de las hifas y la forma de las células que constituyen dichas hifas en la parte basal del excípulo propio es un carácter claramente variable yendo desde hifas verticales casi paralelas, separadas entre sí por mucha matriz y formadas por células alargadas en forma de hueso (tipo I) hasta las hifas muy cercanas y formadas por células casi redondas (tipo IV). La anatomía del excípulo propio es constante a nivel individual y específico, no variando entre distintos cortes del mismo apotecio, ni entre los distintos apotecios del mismo talo, ni siquiera entre talos distintos de la misma especie.

La topología de los diferentes tipos del apotecio parmeliáceo en el árbol filogenético muestra que el tipo II presente está presente en todos los clados de los líquenes parmelioides, excepto uno (clado *Parmeliopsis*). Además está presente en todos los géneros estudiados de los otros clados de la familia *Parmeliaceae*. Esto podría indicar, que el tipo II sea el tipo más ancestral y que los otros tipos se han desarrollado varias veces en distintos géneros a lo largo de la historia evolutiva de *Parmeliaceae*.

Así los tipos I y III del apotecio son unos derivados extendidos del tipo II, y los tipos IV y V parecen ser unos derivados puntuales. El tipo IV está presente solo en dos clados (Hypotrachyna y Parmelina). El tipo V está presente únicamente en un clado de los líquenes parmelioides (clado Parmelia), aunque también se ha encontrado puntualmente en el género *Platismatia*.

De especial interés para la comprensión del valor taxonómico de excípulo propio es el caso del género *Protoparmelia*, considerado perteneciente a la familia *Parmeliaceae* precisamente por la estructura y la ontogenia del apotecio (Miyawaki 1991, Henssen 1995). Su posición en los análisis filogenéticos moleculares es aún dudosa (Arup *et al.* 2007), y tiene características propias en la estructura del excípulo propio, la capa hialina es extremadamente ancha comparando con el resto de las especies parmeliáceas (Henssen 1995, **Capítulo I**). Esta capa hialina fuertemente desarrollada ha sido el carácter que varios autores malinterpretaron como “excípulo propio cupulado”, carácter típico de *Parmeliaceae*, y que sirvió para proponer la inclusión en dicha familia de especies que según nuestros criterios morfológicos y ontológicos no pertenecen a ella (Lumbsch *et al.* 1991, Kantvilas *et al.* 2010, Printzen 2010, Papong *et al.* 2011). Esa interpretación se debe a que las observaciones están basadas en cortes transversales no dirigidos por el centro del apotecio. En esos cortes la capa algal puede rodear la capa hialina por debajo dando la impresión de que la capa hialina forma una cúpula. Si el apotecio hubiera sido cortado directamente por el centro, la capa algal dejaría un espacio a través del cual se conecta la capa hialina y la médula. Nuestras observaciones indican que aunque en muchas descripciones de la estructura de los apotecios en otros géneros (p.ej. *Leptogium* en *Collema* *et al.*; *Gyalecta* y *Ramonia* en *Gyalectaceae*; *Placopsis*, *Trapelia* y *Trapeliopsis* en *Agyriaceae*) aparece el término “excípulo propio cupulado” (por la forma cupular de la capa hialina), en ninguno de los casos es una estructura homóloga a la de la familia *Parmeliaceae*. La estructura del excípulo propio cupulado parmeliáceo con la capa hialina, capa intermedia y capa basal de apariencia cortical rodeada por capa algal continua es una estructura única y característica de la familia *Parmeliaceae*.

La semejanza de la anatomía de la parte basal del excípulo propio con el tejido cortical de los líquenes parmeliáceos se debe a la posición en la que empieza el desarrollo del apotecio. Como el primordio se origina en la zona inferior del córtex superior del talo, siempre por encima de la capa algal, las hifas que contribuyen a la formación del excípulo propio de estos líquenes son hifas corticales (y no medulares como en el resto de hongos liquenizados). Estas hifas se observan igual que en el tejido cortical como relativamente cortas y bifurcadas. Pero no en todas las especies coincide el tipo de córtex con el tipo del excípulo cortical, ya que puede haber diferencias en la cantidad de matriz extracelular del córtex.

Es interesante que Schneider (1897) ya en el siglo XIX, en la descripción de los géneros *Parmelia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Evernia*, *Alectoria* y *Bryopogon*, actualmente pertenecientes a la familia *Parmeliaceae*, destacó la estructura del hipotecio (en nuestro texto nos referimos a esta estructura como el excípulo propio) como más o menos cortical y compuesta de dos capas bien diferenciadas (incluso de tres en el caso de *Alectoria sarmentosa*). Además destaca la doble capa algal en la estructura del apotecio. Basándose en esta observación propone que cada apotecio podría representar un talo secundario y como tal contribuir no solo a la reproducción sino también a la asimilación. Cabe mencionar que ninguno de los autores recientes que trabajaron con la estructura y ontogenia del apotecio parmeliáceo (e.g. Letrouit-Galinou, Henssen, Jahns) se apoyó ni recogió las observaciones de Schneider pero a nosotros nos parece muy importante destacar sus observaciones porque compartimos la misma hipótesis sobre la estructura cortical del excípulo propio. Smith (1921) destaca el desarrollo de los apotecios en *Parmeliaceae* como un modo de variabilidad de los líquenes, señalando que el origen de los ascogonios no está en la capa medular sino que más cerca de la superficie y que desde el comienzo del desarrollo del apotecio, el primordio está rodeado por un tejido parecido al córtex.

Arup *et al.* (2007) mencionan *Gypsoplaca* como un posible grupo hermano de *Parmeliaceae*. Es importante tener en cuenta que sus ascocarpos son continuos con el talo, las hifas ascógenas crecen dentro del córtex superior y lo transforman en el himenio. La capa algal y la médula no se alteran con la transformación del córtex. Cabe preguntarse, si *Parmeliaceae* (incluyendo *Protoparmelia*) y *Gypsoplaca* no podrían tener un pariente común, en el que surgió el desarrollo de los ascogonios por encima de la capa algal e incluyendo así el córtex, como tejido de protección y soporte para los cuerpos fructíferos, lo que permitió el desarrollo de unos apotecios de gran tamaño en los parmeliáceos. En *Gypsoplaca* el himenio se habría quedado integrado en el propio córtex sin ninguna alteración posterior del talo, manteniendo el ascocarpo continuo con el talo, mientras que en los apotecios de *Parmeliaceae* el himenio envuelto por la estructura de apariencia cortical y continua con el córtex, se habría elevado con el crecimiento de talo en forma de la copa. Así podríamos explicar el singular desarrollo del excípulo propio con su parte basal de apariencia cortical de los apotecios en *Parmeliaceae*. En *Lecanoraceae*, el desarrollo del apotecio es medular, los ascogonios aparecen en la médula o zona algal, pero siempre por debajo de la capa algal, a la que junto con el córtex están obligados a romper durante el desarrollo del apotecio, para poder abrirse camino hacia la superficie del talo.

Ascósporas

El estudio de los caracteres finos de la ascóspora en el clado parmelioides nos permite entender mejor la historia evolutiva de este grupo. Mientras la morfología del talo nos ha

permitido hasta ahora agrupar las especies en unos grupos relativamente homogéneos, la anatomía fina desvela, que en cada género existe una o dos especies que se apartan de la característica general del grupo. Estas especies deberían considerarse como especies clave para revelar la historia evolutiva del clado y para el estudio de la evolución de dicho carácter. Podrían constituir un linaje no favorecido o podrían responder a condiciones ambientales específicas y desviantes del resto. Solamente el estudio profundo de cada grupo en relación con grupos hermanos puede dar la respuesta final. Se propone evaluar cada clado monofilético terminal por separado y reconstruir la evolución de los caracteres en cada uno.

A los caracteres de los órganos sexuales se les atribuye mayor importancia en el establecimiento de los géneros naturales correspondiendo a los linajes monofiléticos terminales. En este trabajo se estudia el potencial de los caracteres finos y de la ultraestructura de las esporas como un carácter informativo en la taxonomía y filogenia de los parmelioides (**Capítulos II, III, V**). Este trabajo se ha llevado a cabo a la luz de los datos moleculares existentes y de los datos relacionados recogidos de la bibliografía.

El valor de las ascósporas como carácter taxonómico tiene que ser explorado más y reconsiderarlo a la luz de: (1) los datos adicionales de la ultraestructura en toda la familia y (2) la disponibilidad de datos moleculares aplicados a la filogenia. Aquí se describe la variabilidad y se muestran ejemplos de su utilidad y su valor taxonómico en distintos niveles taxonómicos.

A nivel genérico los caracteres esporales también aportan información de interés en distinto grado. Algunos géneros tienen esporas homogéneas (del mismo tipo, incluso solapándose en tamaño), p.ej. *Xantoparmelia*, *Parmelina*, *Austroparmelina*, que pueden ser utilizados para delimitar el género (**Capítulos III, IV**) aunque no sirven para delimitar las especies. Pero existen géneros que presentan esporas de varios tipos, p.ej. *Remototrachyna*, en los que algunas especies se pueden diferenciar por sus esporas características. Como conclusión, los caracteres de las esporas tienen que ser evaluados individualmente para cada género y no se pueden utilizar los mismos criterios para todos los géneros.

Es de destacar que el valor de los caracteres esporales se ha puesto de manifiesto en algunos géneros en los que la filogenia molecular ya había detectado distintos linajes no relacionados, variabilidad que también se ve reflejada en los caracteres esporales (**Capítulos IV, V**). Otro caso, donde pronosticamos que será un carácter muy útil, es el género *Bulbothrix*, en el que hemos encontrado dos tipos de esporas, que se relacionan con otros caracteres morfológicos (tipo de rizinas), químicos y biogeográficos. La falta de material fresco de la especie tipo para los análisis moleculares no permite hacer cambios nomenclaturales en este género polifilético. Igualmente en el género polifilético *Everniastrum* hemos encontrado tres tipos distintos de esporas. Cabe la posibilidad de que

estén incluidos varios linajes y se necesita un estudio, tanto morfológico como molecular, que incluya mas especies.

Modo de reproducción

El concepto de especie del taxón *Pseudevernia furfuraceae* se discute en relación con el diferente modo de reproducción de sus poblaciones (**Capítulo VI**). Las poblaciones sorediadas de *P. furfuracea* son muy raras aunque fueron documentados en distintas localidades lejanas, Islas Canarias, Marruecos, Austria. Se ha mostrado que no existe monofilia en las líneas sexual o vegetativa (sorediada) y que todos los especímenes forman un clado, incluso algunos con diferentes estrategias reproductoras comparten los mismos haplotipos, como había sido puesto de manifiesto en casos semejantes (Articus *et al.* 2002, Buschbom 2003, Cubero *et al.* 2004, Högborg *et al.* 2002, Lohtander *et al.* 1998a, b, Molina *et al.* 2002, Myllys *et al.* 1999, 2001, Ott *et al.* 2004). Eso significa que el evento de la transición entre el individuo sexual y el vegetativo (sorediado) no puede ser explicado genéticamente de una manera sencilla. Parece más bien que los líquenes de los distintos grupos que forman soredios hayan adquirido ese carácter en un ancestro muy basal y lo expresan solo en algunas ocasiones. Los datos genéticos indican que el carácter puede revertir de nuevo en la descendencia tal como lo presentó Tehler (1982) en su idea inicial. Este autor supuso que debía ocurrir una frecuente y repetida producción de los subproductos (spin-off) vegetativos – sorediados por el individuo fértil. El carácter podría expresarse o no en poblaciones genéticamente muy relacionadas. Las razones para que el carácter se exprese no las conocemos. Pudiera tratarse de alguna presión ecológica (Poelt 1973), como una adaptación puntual a las condiciones ambientales microclimáticas (sombra, humedad) o biológicas (parásitos). Los mismos soralios globulares fueron hallados con poca frecuencia en algunos especímenes de otras especies no sorediadas de la familia (Culberson & Culberson 1968, Poelt 1973), pero sin prestarle importancia como carácter taxonómico y apuntando que los especímenes encontrados parecían moribundos.

En *Parmeliaceae*, los caracteres sexuales han mostrado tener mucha importancia a la hora de la clasificación de los grupos monofiléticos terminales, correspondiendo al nivel de género (géneros modernos). Pero los caracteres morfológicos y anatómicos del talo vegetativo, igual que los extrolitos y geografía, tienen que ser evaluados y considerados como caracteres de apoyo. Por eso, debería intentarse describir cada grupo monofilético terminal, correspondiendo a un género (ya sea antiguo o nuevo) utilizando un conjunto de caracteres, a ser posible de distintas categorías (sexuales, vegetativos, químicos). Así se podría llegar a establecer los géneros naturales (Nimis 1998).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha llevado al cabo el estudio comparativo de los caracteres reproductores de la familia *Parmeliaceae*. Hemos estudiado la estructura del apotecio y los caracteres finos de las esporas en 132 especies permelioides y en 18 otras especies parmeliáceas.

Los nuevos caracteres han permitido a describir nuevos géneros naturales (*Austroparmelina* y *Notoparmelia*, **Capítulos IV** y **V**, respectivamente) e indicar los grupos donde es posible que sirvan como tales al añadir más especies al estudio comparativo (*Hypotrachyna*, *Parmotrema*; **Capítulo I**). Los caracteres derivados de la estructura del apotecio, hasta ahora no utilizados supuestamente por la gran cantidad de especímenes estériles han resultado de gran importancia para la sistemática de la familia *Parmeliaceae* (**Capítulo I**). Es evidente, que estos caracteres no pueden servir para la identificación de los especímenes estériles pero sí que ayudan a entender la historia evolutiva del grupo. Es importante destacar su variabilidad porque forman parte del conjunto de caracteres diversificados en cada linaje. Se propone extender este estudio en profundidad a otros clados de la familia y buscar su valor taxonómico y filogenético. Esperamos que el presente trabajo sirva como estímulo para el estudio comparativo de la estructura del cuerpo fructífero en relación con su ontogenia en otros grupos de hongos liquenizados.

Los caracteres finos de las esporas se han estudiado por primera vez en la familia *Parmeliaceae* (**Capítulo II**) y revelan que este carácter no tiene el mismo peso en todos los grupos. Existen géneros relativamente homogéneos para este carácter a pesar de tener más de ochocientas especies (*Xanthoparmelia*, **Capítulo III**) y grupos heterogéneos con menos de cuarenta especies (*Parmelia*, **Capítulo V**). La variabilidad observada en estos caracteres permite hacer predicciones sobre posibles relaciones y alternativas sistemáticas en los grupos donde por falta de material tipo no pueden hacerse aún cambios formales (*Bulbothrix* vs. *Parmelinella*, *Hypotrachyna* vs. *Parmelinopsis*; **Capítulo II**). Es muy interesante, que en varios géneros la mayoría de las especies tiene esporas del mismo tipo (que sirven como carácter diagnóstico) con una pequeña variabilidad en los caracteres finos pero a la vez existen una o dos especies con esporas desviantes, con el doble de tamaño y grosor de la pared en comparación con las demás especies. Proponemos estudiar la evolución de este carácter en los grupos indicados en paralelo con su posicionamiento filogenético y llevar al cabo los análisis de reconstrucción del estado ancestral. Estos estados desviantes podrían representar bien estados ancestrales o situaciones derivadas debido a la adaptación al ambiente o a factores ecológicos, lo que aún se desconoce.

Además, las estrategias reproductivas estudiadas en *Pseudevernia furfuracea* (**Capítulo VI**) han permitido concluir, que la diferencia en el modo de la reproducción

(sexual vs. vegetativa) no puede utilizarse como carácter *a priori* para describir nuevas especies. Los análisis moleculares confirman que las poblaciones con diferentes modos reproductivos no están genéticamente aisladas sino que forman un continuo. A pesar de que la presencia de los soralioides es un carácter muy llamativo y fácil de reconocer, se ha visto que no es un carácter válido para la delimitación de las especies. Se propone llevar a cabo estudios genéticos en búsqueda de los mecanismos que disparan su formación. Igualmente, se propone a estudiar otros pares de especies en la familia *Parmeliaceae* donde abundan los complejos de especies para elucidar y aclarar el concepto de la especie.

Ninguno de los caracteres estudiados hasta ahora (morfológicos, anatómicos, ontogenéticos, químicos, biogeográficos) sirve como carácter universal en la clasificación sistemática ni como carácter *a priori* para las hipótesis evolutivas de los hongos liquenizados en general ni tampoco a nivel de familia. Un ejemplo es la familia *Parmeliaceae*, el objeto de la presente memoria doctoral. La reconstrucción filogenética es posible sólo con los análisis moleculares. *A posteriori* sí que es posible encontrar caracteres que pueden diagnosticar los linajes separados, es decir los grupos monofiléticos. Para ello es muy importante llevar a cabo estudios comparativos tanto entre los miembros del grupo como con los taxones externos relacionados y, sobre todo, conocer a fondo el grupo estudiado y todos sus caracteres, para poder identificar los caracteres apropiados.

Se puede concluir como principales resultados de esta tesis que:

1. Los caracteres que se evalúan como posibles caracteres taxonómicos tienen que estudiarse en todos los taxones posibles dentro y fuera del grupo, y no solo en los aspectos puramente morfológicos sino que es importante entender su desarrollo ontogénico. Así se pueden llevar al cabo los estudios comparativos necesarios para poder entender la variabilidad del carácter. Contrastando los caracteres evaluados con la topología de los árboles filogenéticos moleculares es posible detectar su valor taxonómico en algunos grupos. Este enfoque permite describir los grupos monofiléticos y seguir el rastro de la historia evolutiva de los caracteres importantes en el grupo estudiado. **(Capítulos I, II)**

2. El único carácter sinapomórfico de la familia *Parmeliaceae* es la estructura del apotecio con excípulo propio cupulado con anatomía cortical, debido a su desarrollo ontogénico supraalgal. Este tipo de apotecio lo denominamos como "apotecio parmeliáceo". La variabilidad de la anatomía del apotecio parmeliáceo permite reconocer cinco tipos. **(Capítulo I)**

3. Las esporas hialinas, unicelulares es un carácter compartido para el clado parmeliode y podría ser el carácter ancestral plesiomórfico en la familia. La variabilidad en los caracteres finos de las esporas permite diferenciar cinco tipos. (**Capítulo II**)

4. Los clados principales de la familia *Parmeliaceae* al igual que los del grupo parmeliode son heterogéneos en los caracteres aquí estudiados. (**Capítulos I y II**)

5. Los distintos estados de los caracteres reproductivos aquí estudiados son homoplásicos a nivel de familia *Parmeliaceae*, incluso dentro del clado principal parmeliode pero su valor es muy importante a la hora de delimitar algunos linajes monofiléticos a nivel de género. Así sirven como carácter adicional en la diagnosis de nuevos géneros. (**Capítulos III, IV y V**)

6. El carácter sinapomórfico del género *Xanthoparmelia* es la spora pequeña con la pared fina y el vacuoma arachiforme. (**Capítulo III**)

7. El género *Parmelina* (en su sentido tradicional morfológico) es polifilético y la estructura del apotecio, especialmente la anatomía del excípulo propio, es el carácter principal en la descripción del nuevo género *Austroparmelina*. (**Capítulo IV**)

8. El género *Parmelia s.lat.* (en su sentido tradicional morfológico) está compuesto por tres grupos independientes, uno de ellos, *Notoparmelia*, descrito en esta tesis como nuevo, basándose en la estructura del apotecio y en sus características esporales. (**Capítulo V**)

9. A pesar de que la presencia de los soralioides es un carácter tradicionalmente utilizado en la delimitación de especies, en el presente trabajo se ha visto que no refleja aislamiento poblacional ni evolutivo. Además se baraja la posibilidad de que su presencia pueda estar inducida por factores externos. (**Capítulo VI**)

CONCLUSIONS

It can be concluded as the main results of this thesis:

1. When assessing the taxonomic potential of new morphological characters is of great importance to study all possible taxa within and outside the group of interest. In addition to the morphological study, it is very important to study the ontogeny of the selected characters. This approach is useful for understanding the character variability found by comparative studies. The evaluation of the different character states in the light of phylogenetic topology, can help to establish the taxonomic value of the selected character, describe monophyletic groups and trace the evolutionary history of the major characters in the studied group. (**Chapters I, II**)

2. The peculiar anatomy of the apothecia in *Parmeliaceae* with the three-layered cupular proper exciple composed of hyaline, intermediate, and cortex-like basal layer seems to be a unique synapomorphic character of the family. We have denominated such apothecia as "parmeliaceous". Five types of parmeliaceous apothecia are recognized based on the variability of the proper exciple structure, mainly of the cortex-like structure. The development of this structure is due to the supra-algal (cortical) ontogeny of this reproductive structure. (**Chapter I**)

3. The hyaline, ellipsoidal, unicellular spore-type is a shared character for the parmelioid clade and could be considered as the ancestral plesiomorphic character in the family. The variability in the fine morphology and the dimensions differentiates five parmelioid spore types. (**Chapter II**)

4. The major clades of the family *Parmeliaceae* and also those of the parmelioid lineage are heterogeneous in the characters studied here. (**Chapters I and II**)

5. The different character states of the reproductive structures here studied are homoplasious at the family level and also within the main parmelioid clades. In spite of this, they are valuable in some monophyletic lineages at the genus level, and they are very useful as additional characters in the description and diagnosis of modern genera. (**Chapters III, IV and V**)

6. The synapomorphic character of the genus *Xanthoparmelia* is the presence of a small spore with thin wall and arachiform (peanut-shaped) vacuole. (**Chapter III**)

7. Genus *Parmelina* (in the traditional morphological sense) is shown to be polyphyletic. The apothecium structure, especially the anatomy of the proper exciple, is the main character in the diagnosis of the new genus *Austroparmelina*, together with the spore type and geography. (**Chapter IV**)

8. The genus *Parmelia* s. lat. (in the traditional morphological sense) consists of three independent groups, one of them, *Notoparmelia*, is described here as a new genus, based on the structure of the proper exciple and spore features. (**Chapter V**)

9. Although the presence of soralia has been traditionally used for delimitation of species, the present study shows that it does not reflect evolutionary and population isolation. Moreover, it is hypothesized here that their presence could be induced by external factors. (**Chapter VI**)

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Acharius, E. (1798) *Lichenographia Suecica Prodrum*. Linköping: D.J. Björn.
- Acharius, E. (1803) *Methodus qua Omnes Detectos Lichenes*. Stockholm: F. D. D. Ulrich.
- Ahti, T. (1966) *Parmelia olivacea* and the allied nonisidiate and non-sorediate corticolous lichens in the Northern Hemisphere. *Acta Botanica Fennica* 70: 1–68.
- Amo de Paz, G., Lumbsch, H. T., Cubas, P., Elix, J. A. & Crespo, A. (2010a) The morphologically deviating genera *Omphalodiella* and *Placoparmelia* belong to *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae). *Bryologist* 113: 376–386.
- Amo de Paz, G., Lumbsch, H. T., Cubas, P., Elix, J. A. & Crespo, A. (2010b) The genus *Karoowia* (Parmeliaceae, Ascomycota) includes unrelated clades nested within *Xanthoparmelia*. *Australian Systematic Botany* 23: 173–184.
- Andersen, H. L. & Ekman, S. (2005) Disintegration of the *Micareaceae* (lichenized Ascomycota): a molecular phylogeny based on mitochondrial rDNA sequences. *Mycological Research* 109(1): 21–30.
- Armstrong, R. A. (1987) Dispersal in a population of the lichen *Hypogymnia physodes*. *Environmental and Experimental Botany* 27: 357–363.
- Armstrong, R. A. (1991) The influence of climate on the dispersal of lichen soredia. *Environmental and Experimental Botany* 31: 239–245.
- Armstrong, R. A. (1992) Soredia dispersal from individual soralia in the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. *Environmental and Experimental Botany* 32: 55–63.
- Armstrong, R. A. (1994) Dispersal of soredia from individual soralia of the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. in a simple wind tunnel. *Environmental and Experimental Botany* 34: 39–45.
- Articus, K., Mattsson, J.-E., Tibell, L., Grube, M. & Wedin, M. (2002) Ribosomal DNA and betatubulin data do not support the separation of the lichens *Usnea florida* and *U. subfloridana* as distinct species. *Mycological Research* 106: 412–418.
- Arup, U. & Grube, M. (1999) Where does *Lecanora demissa* (Ascomycota, Lecanorales) belong?. *Lichenologist* 31(5): 419–430.
- Arup, U., Ekman, S., Grube, M., Mattsson, J.-E. & Wedin, M. (2007) The sister group relation of *Parmeliaceae* (Lecanorales, Ascomycota). *Mycologia* 99(1): 42–49.
- Bachmann, F. M. (1913) Origin and development of the apothecium in *Collema pulposum* (Bernh.) Ach. *Archiv für Zellforschung* 10: 369–430.
- Bailey, R. H. (1970) Animals and the dispersal of soredia from *Lecanora conizaeoides* Nyl. ex Cromb. *Lichenologist* 4: 256.
- Bailey, R. H. (1976) Ecological aspects of dispersal and establishment in lichens. In *Lichenology: Progress and Problems* (D. H. Brown, D. L. Hawksworth & R. H. Bailey, eds): 215–224. London: Academic Press.

- Bailey, R. H. & James, P. W. (1979) Birds and dispersal of lichen propagules. *Lichenologist* 11: 105–106.
- de Bary, A. (1884) Vergleichende Morphologien und Biologie der Pilze Mycetozen und Bakterien. Leipzig. pp.584.
- Baur, E. (1898) Zur Frage nach der Sexualität der Collemaceen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 16: 363-367.
- Baur, E. (1901) Die Anlage und Entwicklung einiger Flechtenapothecien. *Flora* 88: 319-332.
- Baur, E. (1904) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Flechtenapothecien I. *Botanische Zeitung* 2: 1-26.
- Bellemère, A. & Hafellner, J. (1983) L'appareil des asques et la paroi des ascospores du *Catolechia wahlenbergii* (Ach.) Flotow ex Koerber et de l'*Epilichen scabrosus* (Ach.) Clem. ex Haf. (Lichens, Lecanorales): étude ultrastructurale. *Cryptogamie, Bryologie et Lichenologie* 4: 1-36.
- Bellemère, A. & Letrouit-Galinou, M.A. (1988) Asci, ascospores and ascomata. In: CRC Handbook of lichenology, Volume I, Galun, M. (Ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Blanco, O., Crespo, A., Elix, J. A., Hawksworth, D. L. & Lumbsch, H. T. (2004a) A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing Xanthoparmelia-type lichens (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* 53: 959–975.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P. K., Esslinger, T. L., Hawksworth, D. L. & Lumbsch, H. T. (2004b) *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *Mycological Research* 108: 873–884.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P. K., Elix, J. A. & Lumbsch, H. T. (2005) Molecular phylogeny of parmotrema-like lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). *Mycologia* 97(1): 150-159.
- Borzi, A. (1878) Studi sulla sessualità degli Ascomiceti. *Nuovo giornale botanico italiano* 10: 43-78.
- Bowler, P. A. & Rundel, P. W. (1975) Reproductive strategies in lichens. *Bot. Jour. Linn. Soc.* 70: 325-340.
- Brodie, H. J. & Gregory, P. H. (1953) The action of wind in the dispersal of spores from cup-shaped plants structures. *Canad. Jour. Bot.* 31(4): 402-410.
- Buschbom, J. (2003) Evolutionary history and processes underlying contrasting reproductive modes in the lichen-forming genus *Porpidia* (Ascomycota). Tesis doctoral. University of Chicago, Illinois, USA.
- Buschbom, J. & Barker, D. (2006) Evolutionary history of vegetative reproduction in *Porpidia* s.l. (lichen-forming Ascomycota). *Systematic Biology* 55(3): 471-484.

- Buschbom, J. & Müller, G. M. (2006) Testing 'species pair' hypotheses: evolutionary processes in the lichen-forming species complex *Porpidia flavocoerulescens* and *P. melinodes*. *Molecular Biology and Evolution* 23: 574–586.
- Chadefaud, M. (1960) Traite de Botanique Systematique. Tome I. Les Vegetaux Non Vascularies (Cryptogamie). Masson & Cie Editeurs, Paris. 1018 pp.
- Chadefaud, M. (1964) Sur l'origine de la structure des asques du type annellasse. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 258: 299–301.
- Chadefaud, M., Letrouit-Galinou, M.A. & Favre, M.C. (1963) Sur l'evolution des asques du type archaeasce chez les Discomycetes de l'ordre des Lecanorales. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 257: 4003–4005.
- Clauzade, G. & Roux, C. (1986) ['1985']. Likenoj de Okcidenta Europo. Ilustrita Determinlibro. *Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest*, Numero Special 7: 1–893.
- Coxson, D., Webber, M. R. & Kershaw, K. A. (1984) The thermal operating environment of corticolous and pendulous tree lichens. *Bryologist* 87: 197–202.
- Crespo, A., Gavilán, R., Elix, J. A. & Gutiérrez, G. (1999) A comparison of morphological, chemical and molecular characters in some parmelioid genera. *Lichenologist* 31: 451–460.
- Crespo, A., Blanco, O. & Hawksworth, D. L. (2001) The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilising generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* 50: 807–819.
- Crespo, A., Molina, M. C., Blanco, O., Schroeter, B., Sancho, L. G. & Hawksworth, D. L. (2002) rDNA ITS and beta-tubulin gene sequence analyses reveal two monophyletic groups within the cosmopolitan lichen *Parmelia saxatilis*. *Mycological Research* 106(7): 788–795.
- Crespo, A., Argüello, A., Blanco, O., Gasca, C. & Molina, M. C. (2004a) Los caracteres taxonomicos en liquenes: una nueva perspectiva. Universidad Rey Juan Carlos, Madrid. 32 pp.
- Crespo, A., Blanco, O., Llimona, X., Ferencova, Z. & Hawksworth, D. L. (2004b) *Coscinocladium*, an overlooked endemic and monotypic Mediterranean lichen genus of *Physciaceae*, reinstated by molecular phylogenetic analysis. *Taxon* 53(2): 405–414.
- Crespo, A., Lumbsch, H. T., Mattsson, J.-E., Blanco, O., Divakar, P. K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan, P. & Wedin, M. (2007) Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB-1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 812–824.
- Crespo, A. & Pérez-Ortega, S. (2009) Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66: 71–81.

- Crespo, A., Ferencova, Z., Pérez-Ortega, S., Argüello, A., Elix, J. A. & Divakar, P. K. (2010a) *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Systematics and Biodiversity* 8: 209–221.
- Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P.K., del Prado, R., Perez-Ortega, S., de Paz, G.A., Ferencova, Z., Blanco, O., Roca-Valiente, B., Nunez-Zapata, J., Cubas, P., Argüello, A., Elix, J.A., Esslinger, T.L., Hawksworth, D.L., Millanes, A., Molina, M.C., Wedin, M., Ahti, T., Aptroot, A., Barreno, E., Bungartz, F., Calvelo, S., Candan, M., Cole, M., Ertz, D., Goffinet, B., Lindblom, L., Lücking, R., Lutzoni, F., Mattsson, J.-E., Messuti, M.I., Miadlikowska, J., Piercey-Normore, M., Rico, V.J., Sipman, H.J.M., Schmitt, I., Spribille, T., Thell, A., Thor, G., Upreti, D.K. & Lumbsch, H.T. (2010b) Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59: 1735–1753.
- Crespo, A., Divakar, P. K. & Hawksworth, D.L. (2011) Generic concepts in parmelioid lichens, and the phylogenetic value of characters used in their circumscription. *Lichenologist* 43(6): 511–535.
- Cubero, O. F., Crespo, A., Esslinger, T. L. & Lumbsch, H. T. (2004) Molecular phylogeny of the genus *Physconia* (Ascomycota, Lecanorales) inferred from a Bayesian analysis of nuclear ITS rDNA sequences. *Mycological Research* 108: 498–505.
- Culberson, W. L. & Culberson, C. F. (1968) The lichen genera *Cetrelia* and *Platismatia* (Parmeliaceae). *Contributions from the United States National Herbarium* 34: 449–558.
- Dibben, M. J. (1982) Evolutionary trends within the Pertusariae (lichenized fungi). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 343–355.
- Divakar, P. K. & Upreti, D. K. (2005) *Parmelioid Lichens in India (A Revisionary Study)*. Dehradun: Bishen Singh Mahendra Pal Singh.
- Divakar, P. K., Crespo, A., Blanco, O. & Lumbsch, H. T. (2006) Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical Hypotrachyna clade of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 448–458.
- Divakar, P. K., Lumbsch, H. T., Ferencova, Z., Del Prado, R. & Crespo, A. (2010) *Remototrachyna*, a newly recognized tropical lineage of lichens in the Hypotrachyna clade (Parmeliaceae, Ascomycota), originated in the Indian subcontinent. *American Journal of Botany* 97: 579–590.
- Du Rietz, G. E. (1924) Die Soredien und Isidien der Flechten. *Svensk Botanisk Tidskrift* 18: 371–396.
- Ekman, S. & Wedin, M. (2000) The phylogeny of the families *Lecanoraceae* and *Bacidiaceae* (lichenized Ascomycota) inferred from nuclear SSU rDNA sequences. *Plant Biology* 2: 350–360.

- Ekman, S. & Tønsberg, T. (2002) Most species of *Lepraria* and *Leproloma* form a monophyletic group closely related to *Stereocaulon*. *Mycological Research* 106: 1262–1276.
- Ekman, S., Andersen, H.L. & Wedin, M. (2008) The limitations of ancestral state reconstruction and the evolution of the ascus in the Lecanorales (lichenized Ascomycota). *Systematic Biology* 57(1): 141–156.
- Elix, J. A. (1993) Progress in generic delimitation of *Parmelia* sensu lato lichens (Ascomycotina: *Parmeliaceae*) and a synoptic key to the *Parmeliaceae*. *Bryologist* 96: 359–383.
- Elix, J. A. (1994) Lichens-Lecanorales 2, *Parmeliaceae*. *Flora of Australia* 55: 1–360.
- Elix, J. A. & Hale, M. E. (1987). *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis* and *Parmotremopsis*, five new genera in the *Parmeliaceae* (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* 31: 491–510.
- Erbisch, F. H. (1969) Ascus and ascospore development of five species of the lichen-forming genus *Pertusaria*. *Bryologist* 72: 178–199.
- Eriksson, O. E. (2006) Outline of Ascomycota—2006. *Myconet* 12: 1–82.
- Eriksson, O. E. & Hawksworth, D. L. (1998) Outline of the ascomycetes— 1998. *Systema Ascomycetum* 16: 83–301.
- Feige, G.B. & Lumbsch, H.T. (1998) The ascoma development in *Arctopeltis thuleana* (*Lecanoraceae*) and its systematic significance. *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* 19(2-3): 147–153.
- Fries, T. M. (1861) *Genera Heterolichenum Europaea Recognita*. Uppsala: Edquist.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Gargas, A., DePriest, P.T., Grube, M. & Tehler, A. (1995) Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492–1495.
- Gaya, E., Lutzoni, F., Zoller, S. & Navarro-Rosinés, P. (2003) Phylogenetic study of *Fulgensia* and allied *Caloplaca* and *Xanthoria* species (*Teloschistaceae*, lichen-forming Ascomycota). *American Journal of Botany* 90(7): 1095–1103.
- Glück, H. (1899) Entwurf zu einer vergleichenden Morphologie der Flechtenspermogonien. *Verhandlungen des Naturhistorisch-medizinischen Vereins zu Heidelberg* 6: 81–216.
- Grube, M. & Hawksworth, D. L. (2007) Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era. *Mycological Research* 111: 1116–1132.
- Hafellner, J., Hertel, H., Rambold, G. & Timdal, E. (1994) Lecanorales. In: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties* (Hawksworth, D. L., ed.): 379–387. [NATO Advanced Science Institutes Series, A: Life Sciences no. 269.] New York: Plenum Press.

- Hafellner, J. & Obermayer, W. (2004) Beobachtungen an einer sorediösen Population von *Pseudevernia furfuracea*. *Herzogia* 17: 45–50.
- Hale, M. E. (1965) A monograph of *Parmelia* subgenus *Amphigymnia*. *Contributions from the United States National Herbarium* 36: 193–358.
- Hale, M. E. (1968) A synopsis of the lichen genus *Pseudevernia*. *Bryologist* 71: 1–11.
- Hale, M. E. (1974) *Bulbothrix*, *Parmelina*, *Relicina*, and *Xanthoparmelia*, four new genera in the *Parmeliaceae* (Lichenes). *Phytologia* 28: 479–490.
- Hale, M. E. (1976) A monograph of the lichen genus *Parmelina* Hale (*Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 33: 1–60.
- Hale, M. E. (1984a) An historical review of the genus concept in lichenology. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 79: 11–23.
- Hale, M. E. (1984b) *Flavopunctelia*, a new genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* 20: 681–682.
- Hale, M. E. (1986a) *Arctoparmelia*, a new genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* 25: 251–254.
- Hale, M. E. (1986b) *Flavoparmelia*, a new genus in the lichen family *Parmeliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* 25: 603–605.
- Hale, M. E. (1987) A monograph of the lichen genus *Parmelia* Acharius sensu stricto (Ascomycotina: *Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 66: 1–55.
- Hale, M. E. (1988) *Namakwa*, a new lichen genus in the *Parmeliaceae* (Ascomycotina: *Parmeliaceae*). *Mycotaxon* 32: 169–174.
- Hale, M. E. (1990) A synopsis of the lichen genus *Xanthoparmelia* (Vainio) Hale (Ascomycotina, *Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* 74: 1–250.
- Hawksworth, D. L. (1988). [Review of:] J. A. Elix, J. Johnston & P. M. Armstrong: A Revision of the Lichen Genus *Xanthoparmelia* in Australasia. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, Botany 15(3): 163–362. 1986. *Lichenologist* 20(3): 302–303.
- Hawksworth, D.L. (1994) *Ascomycete Systematics. Problems and Perspectives in the Nineties*. NATO Advanced Science Institute Series, 269, Plenum Press, New York. 453 pp.
- Henssen, A. (in cooperation with Keuck, G., Renner, B. & Vobis, G.) (1981) The lecanorean centrum. In: Reynolds, D.R. (Ed.), *Ascomycete systematics - The Luttrellian concept*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 138–234.
- Henssen, A. (1991) *Omphalodiella patagonica*, a new peltate lichen genus and species from South America. *Lichenologist* 23: 333–342.
- Henssen, A. (1992a) Thallus morphology and apothecial development in *Omphalodium pisacomense* and *Omphalora arizonica* (*Parmeliaceae*). *Lichenologist* 24(1): 27–41.
- Henssen, A. (1992b) *Placoparmelia patagonica*, a new lichen genus and species from Argentina (*Parmeliaceae*). *Lichenologist* 24(2), 133–142.
- Henssen, A. (1995) Apothecial structure and development in *Protoparmelia badia* (*Parmeliaceae* s. lat.). In: Daniels, F.J.A., Schulz, M. & Peine, J. (Eds.) *Flechten*

- Follmann. Contributions to lichenology in honor of Gerhard Follmann. Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group. Cologne: Botanical Institute, University of Cologne. p. 55–62.
- Henssen, A. & Jahns, H.M. (1974) Lichenes, Eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 467 pp.
- Henssen, A. & Titze, A (1992) *Neofuscelia squamarina* and *Neofuscelia almbornii* sp.nov. (*Parmeliaceae*). *Lichenologist* 24(3): 203-213.
- Honegger (1978) The ascus apex in lichenized Fungi I. The Lecanora-, Peltigera- and Teloschistes- types. *Lichenologist* 10(1): 47-67.
- Honegger, R (1980) The ascus apex in lichenized fungi II. The Rhizocarpon-type. *Lichenologist* 12: 157-172.
- Honegger, R (1982) Ascus structure and function, ascospore delimitation, and phycobiont cell wall types associated with the Lecanorales (lichenized ascomycetes). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 417-429.
- Honegger, R. (1984) Scanning electron microscopy of the contact site of conidia and trichogynes in *Cladonia furcata*. *Lichenologist* 16: 11-19.
- Högberg, N., Kroken, S., Thor, G. & Taylor, J. W. (2002) Reproductive mode and genetic variation suggest a North American origin of European *Letharia vulpina*. *Molecular Ecology* 11: 1191-1196.
- Ihlen, P. G. & Ekman, S. (2002) Outline of phylogeny and character evolution in *Rhizocarpon* (*Rhizocarpaceae*, lichenized Ascomycota) based on nuclear ITS and mitochondrial SSU ribosomal DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* 77: 535-546.
- Jahns, H. M. (1973) The trichogynes of *Pilophorus strumaticus*. *Bryologist* 76: 414-418.
- Jahns, H. M. (1984) Morphology, reproduction and water relations—a system of morphogenetic interactions in *Parmelia saxatilis*. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 79: 715–737.
- Jahns, H. M., Herold, K. & Beltman, H. A. (1978) Chronological sequence, synchronization and induction of development of fruit bodies in *Cladonia furcata* var. *furcata* (Huds.) Schrad. *Nova Hedwigia* 30: 469-526.
- Jahns, M., Sensen, M. & Ott, S. (1995) Significance of developmental structures in lichens, especially in the genus *Cladonia*. *Annales Botanici Fennici* 32(1): 35-48.
- Kantvilas, G., Pamong, K. & Lumbsch, H.T. (2010) Further observations on the genus *Maronina*, with descriptions of two new taxa from Thailand. *Lichenologist* 42(5), 557-561.
- Kärnefelt, I. (1990) Isidiate taxa in the *Teloschistaceae* and their ecological and evolutionary significance. *Lichenologist* 22(3): 307-320.

- Kärnefelt, E.I. & Thell, A. (1992) The evaluation of characters in lichenized families, exemplified with the alectorioid and some parmelioid genera. *Plant Systematics and Evolution* 180: 181-204.
- Kärnefelt, E.I. & Thell, A. (1994) Sexual reproductive characters vs. morphological characters in lichen genera. *Journal of Hattori Botanical Laboratory* 76: 207-219.
- Kärnefelt, I., Mattsson, J.-E. & Thell, A. (1992) Evolution and phylogeny of cetrarioid lichens. *Plant Systematics and Evolution* 183(1-2): 113-160.
- Kärnefelt, E.I., Mattsson, J.-E. & Thell, A. (1993) The lichens genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (*Parmeliaceae*) and their presumed evolutionary affinities. *Bryologist* 96(3): 394-404.
- Kärnefelt, I., Emanuelsson, K. & Thell, A. (1998) Anatomy and systematics of usneoid genera in the *Parmeliaceae*. *Nova Hedwigia* 67(1-2): 71-92.
- Kershaw, K.A. (1983) The thermal operating-environment of a lichen. *Lichenologist* 15: 191-207.
- Krog, H. & Swinscow, T. D. V. (1981) *Parmelia* subgenus *Amphigymnia* (lichens) in East Africa. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany* 9: 143-231.
- Körber, G. W. (1854-55) *Systema Lichenum Germaniae*. Wrocław: Trewendt & Granier.
- Krog, H. (1982a) Evolutionary trends in foliose and fruticose lichens of the *Parmeliaceae*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 303-311.
- Krog, H. (1982b) *Punctelia*, a new lichen genus in the *Parmeliaceae*. *Nordic Journal of Botany* 2: 287-292.
- Kroken, S. & Taylor, J. W. (2001) A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* 93: 38-53.
- Leal, J. A., Prieto, A., Bernabé, M. & Hawksworth, D. L. (2010) An assessment of fungal wall heteromannans as a phylogenetically informative character in ascomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 986-1014.
- Letrouit-Galinou, M. A. (1968) The apothecia of the Discolichens. *Bryologist* 71(4): 297-327.
- Letrouit-Galinou, M.A. (1970) Les Apothécies et les Asques du *Parmelia conspersa* (Discolichen Parméliacée). *Bryologist* 73(1): 39-58.
- Lindau, G. (1888) Über die Anlage und Entwicklung einiger Flechtenapothecien. *Flora* 71: 451-489.
- Linnaeus, C. (1753) *Species plantarum*, exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Holmiae. 1231 pp.
- Lohtander, K., Kallersjö, M. & Tehler, A. (1998a) Dispersal strategies in *Roccellina capensis* (Arthoniales). *Lichenologist* 30: 341-350.

- Lohtander, K., Myllys, L., Sundin, R., Kallersjö, M. & Tehler, A. (1998b) The species pair concept in the lichen *Dendrographa leucophaea* (Arthoniales): analyses based on ITS sequences. *Bryologist* 101: 404–411.
- Lorentsson, S. & Mattsson, J.-E. (1999) New reports of soredia dispersed by ants, *Formica cunicularia*. *Lichenologist* 31: 204–207.
- Lumbsch, H. T. (2000) Phylogeny of filamentous ascomycetes. *Die Naturwissenschaften* 87: 335–342.
- Lumbsch, H. T. & Huhndorf, S. M. (2010) Outline of Ascomycota – 2009. *Myconet* 14: 1–42.
- Lumbsch, H.T., Schmitz, K.E. & Feige, G.B. (1991) "*Lecanora*" *opiniconensis*: a placodioid member of the *Parmeliaceae* (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* 42: 77–87.
- Lumbsch, H. T. (1998) Taxonomic use of metabolic data in lichen-forming fungi. In Chemical Fungal Taxonomy (J. C. Frisvad, P. D. Bridge & D.K. Arora, eds.): 345–387. New York: Marcel Dekker.
- Lumbsch, H. T., Schmitt, I., Döring, H. & Wedin, M. (2001) ITS sequence data suggest variability of ascus types and support ontogenetic characters as phylogenetic discriminators in the Agyriales (Ascomycota). *Mycological Research* 105(3): 265–274.
- Lumbsch, H. T., Wirtz, N., Lindemuth, R. & Schmitt, I. (2002) Higher level phylogenetic relationships of euascomycetes (Pezizomycotina) inferred from a combined analysis of nuclear and mitochondrial sequence data. *Mycological Progress* 1(1): 57–70.
- Lumbsch, H. T., Mangold, A., Lücking, R., García, M. A. & Martín, M. P. (2004) Phylogenetic position of the genera *Nadvornikia* and *Pyrgillus* (Ascomycota) based on molecular data. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 34(1): 9–17.
- Lumbsch, H. T., Schmitt, I., Barker, D. & Pagel, M. (2006) Evolution of micromorphological and chemical characters in the lichen-forming fungal family *Pertusariaceae*. *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 615–626.
- Lumbsch, T. H., Lücking, R. & Tibell, L. (2009) Molecular data place *Tylophoron* as an additional calicioid genus in the Arthoniales (Ascomycota). *Bibliotheca Lichenologica* 99: 285–296.
- Luttrell, E. S. (1951) Taxonomy of the pyrenomycetes. *University of Missouri Studies* 24: 1–120.
- Lutzoni, F., Pagel, M. & Reeb, V. (2001) Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411: 937–940.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G.-H., Lücking, R., Lumbsch, H.T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hall, B., Hansen, K., Harris, R.C., Hosaka, K., Lim, Y.W., Liu, Y., Matheny, B., Nishida, H., PWster, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R. & Vilgalys, R. (2004) Where

- are we in assembling the fungal tree of life, classifying the fungi, and understanding the evolution of their subcellular traits? *American Journal of Botany* 91: 1446–1480.
- Lücking, R., Sipman, H. J. M., Umaña, L., Chaves, J. L. & Lumbsch, H. T. (2007) *Aptrootia* (Dothideomycetes: *Trypetheliaceae*), a new genus of pyrenocarpous lichens for *Thelenella terricola*. *Lichenologist* 39(2): 187–193.
- Massalongo, A. (1852) Monografia dei licheni blasteniospori. *Atti R. Ist. Ven. Sc. Lett. Arti* 2, 3, app. 3: 3–131.
- Miadlikowska, J., Kauff, F., Hofstetter, V., Fraker, E., Grube, M., Hafellner, J., Reeb, V., Hodkinson, B.P., Kukwa, M., Lücking, R., Hestmark, G., Garcia-Otalora, M., Rauhut, A., Büdel, B., Scheidegger, C., Timdal, E., Stenroos, S., Brodo, I., Perlmutter, G.B., Ertz, D., Diederich, P., Lendemer, J.C., Tripp, E., Yahr, R., May, P., Gueidan, C., Spatafora, J.W., Schoch, C., Arnold, A.E., Robertson, C. & Lutzoni, F. (2006) New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA and two protein-coding genes. *Mycologia* 98: 1088–1103.
- Miadlikowska, J., Schoch, C. L., Kageyama, S. A., Molnar, K., Lutzoni, F. & McCune B. (2011) *Hypogymnia* phylogeny, including *Cavernularia*, reveals biogeographic structure. *Bryologist* 114(2): 392–400.
- Miyawaki H. (1991) *Protoparmelia badia* in Japan. *Hikobia* 11: 29–32.
- Moberg, R. (1977) The lichen genus *Physcia* and allied genera in Fennoscandia. *Symb. Bot. Ups.* 22(1): 1–108.
- Molina, M. C., Crespo, A., Blanco, O., Hladun, N. & Hawksworth, D. L. (2002) Molecular phylogeny and status of *Diploicia* and *Diplotomma*, with observations on *Diploicia subcanescens* and *Diplotomma rivas-martinezii*. *Lichenologist* 34: 509–519.
- Myllys, L., Lohtander, K., Källersjö, M. & Tehler, A. (1999) Sequence insertions and ITS data provide congruent information on *Rocella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 295–309.
- Myllys, L., Lohtander, K. & Tehler, A. (2001) Betatubulin, ITS and group I intron sequences challenge the species pair concept in *Physcia aipolia* and *P. caesia*. *Mycologia* 93: 335–343.
- Nannfeldt, J. A. (1932) Studien über die Morphologie und Systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten Discomyceten. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis*. 8: 1–368.
- Nash, T. H. III, Hafellner, J. & Common, R. S. (1990) *Omphalora*, a new genus in the *Parmeliaceae*. *Lichenologist* 22(4): 355–365.
- Nimis, P. L. (1998) A critical appraisal of modern generic concepts in lichenology. *Lichenologist* 30: 427–438.

- Nordin, A. (1997) Ascospore characters in *Physciaceae*: an ultrastructural study. *Acta Univ. Ups. Symb. Bot. Ups.* 32 (1): 195-208.
- Núñez-Zapata, J., Divakar, P.K., del Prado, R., Cubas, P., Hawksworth, D.L. & Crespo, A. (2011) Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from *Parmelina tiliacea* (Ascomycota: *Parmeliaceae*). *Lichenologist* 43(6): 603-616.
- Nylander, W. (1861) Lichenes Scandinaviae (sive Prodrromus Lichenographiae Scandinaviae). *Notiser ur Sällsk. pro Fauna et Flora Fennica Förhandlingar* 5: 1-313.
- Ott, S., Brinkmann, M., Wirtz, N. & Lumbsch, H. T. (2004) Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA data do not support the separation of the Antarctic lichens *Umbilicaria kappenii* and *Umbilicaria antarctica* as distinct species. *Lichenologist* 36 (3-4): 227-234.
- Page, R. D. M. (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Papong, K., Kantvilas, G. & Lumbsch, H.T. (2011) Morphological and molecular evidence places *Maronia* into synonymy with *Protoparmelia* (Ascomycota: Lecanorales). *Lichenologist* 43(6): 561-567.
- Platt, J. L. & Spatafora, J. W. (2000) Evolutionary relationships of nonsexual lichenized fungi: molecular phylogenetic hypotheses for the genera *Siphula* and *Thamnolia* from SSU and LSU rDNA. *Mycologia* 92(3): 475-487.
- Poelt, J. (1970) Das Konzept der Artenpaare bei den Flechten. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 4: 187-198.
- Poelt, J. (1972) Die taxonomische Behandlung von Artenpaaren bei den Flechten. *Botaniska Notiser* 125: 77-81.
- Poelt, J. (1973) Systematic evaluation of morphological characters. In: V. Ahmadjian & M. E. Hale (eds.): *The Lichens*. Academic Press, New York and London, pp. 91-115.
- Poelt, J. & Vězda, A. (1981) Bestimmungsschlüssel europaischer Flechten. *Erganzungsheft II. Bibliotheca Lichenologica* 16: 1-390.
- Printzen, C. (2010) Lichen Systematics: The role of morphological and molecular data to reconstruct phylogenetic relationships. *Progress in Botany* 71: 233-275.
- Printzen, C. & Kantvilas, G. (2004) *Hertelidea*, genus novum Stereocaulacearum (Ascomycetes lichenisati). In: Döbbeler, P. & Rambold, G. (eds.): *Contributions to Lichenology. Festschrift in Honour of Hannes Hertel. Bibliotheca Lichenologica*, J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, pp. 539-553.
- Rambold, G. & Hagedorn, G. (1998) The distribution of selected diagnostic characters in the Lecanorales. *Lichenologist* 30(4-5): 473-487.
- Reeb, V., Lutzoni, F. & Roux, C. (2004) Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the

- lichen-forming *Acarosporaceae* and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 1036-1060.
- Reese Næsborg R. & Van den Boom, P. P. G. (2007) *Lecania belgica* van den Boom & Reese Næsborg, a new saxicolous lichen species from western Europe. *Lichenologist* 39(6): 499-503.
- Rehner, S. A. & Samuels, G. J. (1994) Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.
- Rikkinen, J. (1997) Habitat shifts and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient. In: Tibell, L. & Hedberg, I. (eds.): Lichen Studies Dedicated to Rolf Santesson. *Symbolae Botanicae Upsalienses, Acta Universitatis Upsaliensis*, Uppsala, pp. 223-245.
- Rosendahl, F. (1907) Vergleichend-anatomische Untersuchungen fiber die braunen Parmelien *Nova Ada Acad. Caesar. Leop. Carol.* 87(3): 401-459.
- Santesson, R. (1952) Foliicolous lichens I. A revision of the taxonomy of the obligately foliicolous, lichenized fungi. *Symbolae Bot. Upsal.* 12(1): 1-590.
- Scheidegger, C., Frey, B. & Zoller, S. (1995) Transplantation of symbiotic propagules and thallus fragments: methods for the conservation of threatened epiphytic lichen populations. In: Scheidegger, C, Wolseley, P.A. & Thor, G. (eds.): Conservation Biology of Lichenised Fungi. *Mitteilungen der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft, Birmensdorf, Switzerland*, pp. 41-62.
- Schneider, A. (1897) A text-book of general lichenology. With descriptions and figures of the genera occurring in the northeastern United States. W.N. Clute & Co., Binghamton, 230 pp.
- Schwendener, S. (1867) Über die wahre Natur der Flechten. *Verhandlungen der Schweizer Naturforschenden Gesellschaft* 1867: 88-90.
- Sincock, C. A. (1982) A preliminary investigation of the taxonomic potential of the excipulum proprium's fine structure in the foliose *Parmeliaceae*. M.Sc. thesis, University of Reading.
- Smith, A. L. (1921) A Handbook of the British Lichens. British Museum, London. 160 pp.
- Sojo, F., Romeike, J. & Ott, S. (2003) *Himantormia lugubris* (Hue) M. Lamb - vegetative and reproductive habit: adaptations of an Antarctic endemic. *Flora* 198: 118-126.
- Stahl, E. (1877) Beitrage zur Entwicklungsgeschichte der Flechten, Vol. 1. Leipzig: Felix.
- Steiner, J. (1901) Über die Function und den systematischen Wert der Pycnoconidien der Flechten. In: : Festschrift zur Feier des zweihunderjährigen Bestandes des K.K. Staatsgymnasiums im VIII. Bezirke Wiens, E. Kainz und R. Liebhart, Wien, pp. 38.
- Stenroos, S. K. & DePriest, P. T. (1998) SSU rDNA phylogeny of cladoniiform lichens. *American Journal of Botany* 85: 1548–1559.

- Stizenberger, E. (1862) Beitrag zur Flechtensystematik. *Ber. Thätigk. St. Gallisch. naturw. Ges.* 1861-1862: 124-182.
- Stubbs, C. S. (1995) Dispersal of soredia by the oribatid mite, *Humerobater arborea*. *Mycologia* 87: 454-458.
- Stuessy, T. F. (2009) Plant Taxonomy. The systematic evaluation of comparative data. Columbia University Press. 2nd Edition.
- Swofford, D. L. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. & Fisher, M.C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31: 21-32.
- Tehler, A. (1982) The species pair concept in lichenology. *Taxon* 31: 708–714.
- Tehler, A., Dahlkild, A., Eldenas, P. & Feige, G. B. (2004) The phylogeny and taxonomy of Macaronesian, European and Mediterranean *Roccella* (Roccellaceae, Arthoniales). - *Symbolae Botanicae Upsalienses* 34(1): 405-428.
- Tehler, A., Irestedt, M., Wedin, M. & Ertz, D. (2010) The Old World *Roccella* species outside Europe and Macaronesia: taxonomy, evolution and phylogeny. *Systematics and Biodiversity* 8(2): 223-246.
- Thell, A. (1995) Pycnoconidial types and their presence in cetrarioid lichens (Ascomycotina, Parmeliaceae). *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* 16(4): 247-256.
- Thell, A., Mattsson, J.-E. & Kärnefelt, I. (1995) Lecanoralean ascus types in the lichenized families Alectoriaceae and Parmeliaceae. *Cryptogamic Botany* 5(2), 120-127.
- Tibell, L. (1971) The genus *Cyphelium* in Europe. *Svensk. Bot. Tidskr.* 65: 138-164.
- Tibell, L. (1998) Practice and prejudice in lichen classification. *Lichenologist* 30(4-5): 439-453.
- Tibell, L. & Wedin, M. (2000) Mycocaliciales, a new order for nonlichenized calicioid fungi. *Mycologia* 92(3): 577-581.
- Tretiach, M., Crisafulli, P., Pittao, E., Rinino, S., Roccotiello, E. & Modenesi, P. (2005) Isidia ontogeny and its effect on the CO₂ gas exchanges of the epiphytic lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. *Lichenologist* 37(5): 445-462.
- Vainio, E. A. (1890) Étude sur la classification naturelle et la morphologie des lichens du Brésil. Pars prima. *Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica* 7: 1–247.
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- Vobis, G. (1977) Studies on the germination of lichen conidia. *Lichenologist* 9: 131-136.
- Vobis, G. (1980) Bau und Entwicklung der Flechten-Pycnidien und ihrer Conidien. *Bibliotheca Lichenologica* 14: 1–141.

- Walser, J. C., Zoller, S., Büchler, U. & Scheidegger, C. (2001) Species-specific detection of *Lobaria pulmonaria* (lichenized ascomycete) diaspores in litter samples trapped in snow cover. *Molecular Ecology* 10: 2129-2138.
- Wedin, M. & Tibell, L. (1997) Phylogeny and evolution of *Caliciaceae*, *Mycocaliciaceae*, and *Sphinctrinaceae* (Ascomycota), with notes on the evolution of the prototunicate ascus. *Canadian Journal of Botany* 75: 1236-1242.
- Wedin, M., Döring, H. & Ekman, S. (2000) Molecular phylogeny of the lichen families *Cladoniaceae*, *Sphaerophoraceae*, and *Stereocaulaceae* (Lecanorales, Ascomycotina). *Lichenologist* 32: 171–187.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds): 315–322. San Diego: Academic Press.
- Wirtz, N., Printzen, C., Sancho, L. G. & Lumbsch, H. T. (2006) The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (*Parmeliaceae*, Ascomycota) revisited. *Taxon* 55(2): 367-376.
- Wirtz, N., Printzen, C. & Lumbsch, T. H. (2012) Using haplotype networks, estimation of gene flow and phenotypic characters to understand species delimitation in fungi of a predominantly Antarctic *Usnea* group (Ascomycota, *Parmeliaceae*). *Organisms Diversity and Evolution* 12(1): 17-37.
- Yoshimura, I. (1971) The genus *Lobaria* of eastern Asia. *Jour. Hattori Bot. Lab.* 34: 231-364.
- Zahlbruckner, A. (1926) Lichenes (Flechten). B.Spezieller Teil. In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien (A. Engler, ed.) 8: 61–270. 2nd edn. Leipzig: W. Engelmann.
- Zoller, S., Scheidegger, C. & Spersen, C. (1999) PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* 31: 511–516.
- Zoller, S., Frey, B. & Scheidegger, C. (2000) Juvenile development and diaspore survival in the threatened epiphytic lichen species *Sticta fuliginosa*, *Leptogium saturninum* and *Menegazzia terebrata*: conclusions for in situ conservation. *Plant Biology* 2: 496–503.